

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

EKT-sarja 1973

KAURAN JA OHRAN BEETAGLUKAAANIN MERKITYS JA
RAKENTEEN HAJOAMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

Taija Väre

Helsinki 2020

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author Taija Väre			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Kauran ja ohran beetaglukaanin merkitys ja rakenteen hajoamiseen vaikuttavat tekijät			
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarvikekemia			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Marraskuu 2020	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 72
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Beetaglukaanilla on kyky tuoda viskositeettia ja rakennetta nestemäisiin elintarvikkeisiin. Kyseiset reologiset ominaisuudet ovat tärkeitä elintarviketeollisuudessa, fysikaaliset ominaisuudet ovat syynä beetaglukaanin terveysvaikutuksiin. Beetaglukaanin rakenne ei ole kuitenkaan pysyvä. Rakenteen hajoamista tapahtuu prosessoinnin ja säilytyksen aikana. Elintarvikkeiden muilla makromolekyyleillä ja niiden hapettumisherkkyydellä on merkittävä vaikutus beetaglukaanin pysyvyyteen. Aihetta koskeissa tutkimuksissa on todettu, että hapettuneiden makromolekyylien kuten lipidien lisäksi beetaglukaanin mukana kulkeutuvat yhdisteet, kuten mm. fytaatti, voivat vaikuttaa beetaglukaanin hapettumisstabiilisuuteen ja siten vaikuttaa beetaglukaanin teknologiseen ja fysiologiseen toiminnallisuuteen.</p> <p>Työn tavoitteena oli selvittää kauran ja ohran viljauutteiden koostumus eri makro- ja mikrokomponenttien osalta eli määrittää valittujen yhdisteiden pitoisuus näyteliuoksissa analyttisin menetelmin. Viljauutteiden sisällön analyysistä toivottiin löydettävän selittäviä syy-seuraussuhteita jo aiemmin osittain vastaavista näyteliuoksista tehdyille löydöksille (viskositeetin menetys), koska beetaglukaanin hajoaminen nestemäisissä matriiseissa voi heikentää elintarvikkeiden laatuominaisuuksia.</p> <p>Tämän tutkimuksen näytteistä kaurauutteiden puskuriuutteissa oli eniten fenolisia yhdisteitä, myös lipidejä määritettiin suurimmat pitoisuudet kaurauutteista. Beetaglukaanipitoisuudet vastasivat aikaisempia määrityksiä vastaavista näyttemateriaaleista. Raudan osalta tulokset eivät olleet täysin yhteneväisiä, kun ajatellaan yhteyttä aikaisemmin vastaavista näyttemateriaaleista tehtyihin analyysihin koskien viskositeetin menetystä ja radikaalien muodostumista.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords beetaglukaani, kaura, ohra, fenoliset yhdisteet, fytiinihappo, hapettuminen			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Helsingin yliopiston digitaaliset oppinnäytteet, E-thesis			
<p>Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information</p> <p>EKT-sarja 1973</p> <p>Julkinen 10.11.2020</p>			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Food and Nutrition	
Tekijä — Författare — Author Taija Väre			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Importance of betaglucan in oats and barley and factors influencing structural degradation			
Oppiaine — Läroämne — Subject Food chemistry			
Työn laji — Arbetets art — Level M. Sc. Thesis		Aika — Datum — Month and year November 2020	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 72
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Beta-glucan has the ability to increase viscosity and structure into liquid foods. These rheological properties are important in the food industry, the physical properties are the cause of the health effects of betaglucan. However, the structure of betaglucan is not permanent. Degradation of the structure occurs during processing and storage. Other food macromolecules and their sensitivity to oxidation have a significant effect on the stability of betaglucan. Studies on the subject have shown that in addition to oxidized macromolecules such as lipids, compounds that carry betaglucan, such as e.g. phytate, may affect the oxidative stability of betaglucan and thus affect the technological and physiological functionality of betaglucan.</p> <p>The aim of the study was to determine the composition of oat and barley grain extracts in terms of different macro- and micro-components, ie to determine the concentration of selected compounds in the sample solutions by analytical methods. From the analysis of the content of cereal extracts, it was hoped to find explanatory causal relationships to findings from previously similar sample solutions (loss of viscosity), as the degradation of betaglucan in liquid matrices may impair food quality properties.</p> <p>Of the samples from this study, the buffer extracts of oat extracts contained the most phenolic compounds, and the highest concentrations of lipids were determined from oat extracts. Betaglucan concentrations corresponded to previous determinations from corresponding sample materials. For iron, the results were not entirely consistent when related to analyzes previously performed on similar sample materials for viscosity loss and radical formation.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords betaglucan, oat, barley, phenolic compounds, phytate acid, oxidation			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Digital thesis of the University of Helsinki, E-thesis			
Muuta tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-series. Public 10.11.2020			

ESIPUHE

Maisterin tutkielma kokeellisen osan näyteanalyysit tehtiin Helsingin yliopiston maatalous-metsätieteellisen tiedekunnan viljateknologian, elintarvikekemian, yleisen kemian ja metsäekologian laboratorioissa.

Työn ohjaajina toimivat yliopiston lehtori Tuula Sontag-Strohm ja professori Vieno Piironen. Kiitos ohjaajilleni ohjaamisesta, neuvoista ja tuesta.

Erityiskiitos perheelleni, vanhemmilleni ja veljelleni, joita ilman en olisi nyt tässä sekä ystäväilleni kannustuksesta työni loppuun saattamisessa.

Helsingissä 10.11.2020

Taija Väre

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ESIPUHE

I JOHDANTO	6
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	8
2.1 Kaura ja Ohra	8
2.1.1 Viljan jyvän rakenne	8
2.1.2 Kauran ja ohran jyvän koostumus	9
2.1.3 Fytiinihapon rakenne, sijainti jyvässä ja rooli	10
2.1.4 Beetaglukaanin rakenne, sijainti jyvässä ja rooli	11
2.1.5 Beetaglukaanin terveysvaikutukset ja teknologiset ominaisuudet	13
2.2 Hapettuminen kasvimateriaalissa	16
2.2.1 Metalli-ionit kasvimateriaalissa ja niiden merkitys hapen reaktioissa	17
2.2.2 Makromolekyylien hapettuminen	19
2.2.3 Lipidien hapettuminen	19
2.2.4 Hiilihydraattien hapettuminen	21
2.2.5 Proteiinien hapettuminen	22
2.2.6 Aktiivinen happi	23
2.2.7 Vetyperoksidin muodostuminen ja lähteet	24
2.2.8.1 Kelaattorit	26
2.2.8.2 Fenoliset yhdisteet	26
2.3 Ohran ja kauran beetaglukaanin eristäminen ja reologia	28
2.3.1 Beetaglukaanin eristäminen viljamateriaalista	28
2.3.2 Beetaglukaani vesiliuoksessa	28
2.3.3 Beetaglukaanin pysyvyys	29
2.3.4 Beetaglukaanin viskositeettiin vaikuttavat tekijät	30
2.4 Beetaglukaanin rakennetta hajottavat tekijät	31
2.4.1 Olosuhteet ja säilytys	31
2.4.2 Liuoksen fysikaaliset olosuhteet	32
2.5 Viljauutteiden analytiikkaan sopivia menetelmiä	32
2.5.1 Kivennäisaineet ja ICP-MS	32

	6
2.5.2 Rasvahappoanalyysi kaasukromatografialla	33
2.5.3 Lipidimääritys ohutlevykromatografialla (TLC)	33
2.5.4 Proteiinipitoisuuden määrittäminen typpipitoisuuden perusteella	33
2.5.5 Fenolisten yhdisteiden määrittäminen UHPLC-kromatografialla	34
2.5.6 Beetaglukaanin määrittäminen entsymaattisesti	34
3 KOKEELLINEN TUTKIMUS	35
3.1 Materiaalit ja menetelmät	35
3.1.1 Materiaalit	35
3.1.1.1 Näytteet	36
3.1.2 Menetelmät	37
3.1.2.1 Näyteuutteiden valmistus	37
3.1.2.2 Kivennäisaineanalyysi	38
3.1.2.3 Proteiinimääritys	39
3.1.2.4 Fenoliset yhdisteet ja määrittäminen nestekromatografisesti	39
3.1.2.5 Beetaglukaanin määrittäminen entsymaattisesti	39
3.1.2.6 Rasvahappoanalyysi ja lipidien määrittäminen	41
3.1.2.7 Kosteuspitoisuuden määrittäminen kaappikuivausmenetelmällä	43
3.2 Tulokset	43
3.2.1 Näyteuutteiden beetaglukaanipitoisuudet	43
3.2.2 Näyteuutteiden proteiinipitoisuus	44
3.2.3 Näyteuutteiden fenolisten yhdisteiden pitoisuus	45
3.2.4 Näyteuutteiden mineraalipitoisuus	50
3.2.5 Näyteuutteiden rasvahappomäärät	50
3.2.6 Näyteuutteiden lipidifraktiot	51
3.3 Pohdinta	55
3.3.1 Uutteiden beetaglukaanipitoisuus	55
3.3.2 Uutteiden proteiinipitoisuus	55
3.3.3 Uutteiden fenoliset yhdisteet	56
3.3.4 Kivennäisaineet näyteuutteissa	57
3.3.5 Näyteuutteiden rasvahapot ja lipidit	58
4 PÄÄTELMÄT	60
5 LÄHDELUETTELO	62
LIITTEET	67

1 JOHDANTO

Ohra on maailman vanhimpia viljelykasveja. Muut viljat, kuten vehnä ja riisi, ovat nykypäivänä pääosin syrjäyttäneet ohran niiden paremman teknologisen sopivuuden vuoksi; ne antavat paremman suutuntuman sekä laadun lopputuotteelle kuin ohra. Kaura puolestaan on viime vuosina ollut elintarviketeollisuudessa erityisenä kiinnostuksen kohteena ja kaurapohjaisten tuotteiden markkina on kasvanut merkittävästi. Sekä ohran että kauran käyttötarkoituksista elintarviketeollisuudessa ollaan kiinnostuneita mm. terveyteen liittyvien ja teknologisten ominaisuuksien vuoksi. Näihin molempiin ominaisuuksiin liittyy ohran ja kauran sisältämä liukoinen ravintokuitu beetaglukaani.

Beetaglukaenin hyödyt terveydelle on todistettu jo muutama vuosikymmen sitten. FDA (The Food and Drug Administration) on hyväksynyt terveystäiteen koskien liukoista kauran beetaglukaania. 3g liukoista kauran beetaglukaania voi alentaa sepelvaltimotaudin riskiä (FDA, 1997). Johanssonin (2008) väitöskirjan mukaan myös ohran beetaglukaanilla on samankaltaisia terveysvaikutuksia, jotka Bordon ym. (1999) sekä Kalra ja Jood (2000) sekä Cavallero (2002) ovat todistaneet tutkimuksissaan. Myös EFSA (Euroopan elintarviketurvallisuusviranomainen) on antanut puoltavia lausuntoja beetaglukaenin terveystäittämiin koskien beetaglukaanien verensokeria tasaavia ominaisuuksia sekä kolesteroliarvoja parantavia väittämiä (2009,2010). Euroopan komissio on hyväksynyt terveystäitteet beetaglukaenin myönteisistä vaikutuksista kolesteroliarvoihin: ”Betaglukaanit edistävät veren kolesterolitasojen pysymistä normaalina” ja verensokeria tasaaviin ominaisuuksiin: ”Kaurasta ja ohrasta peräisin olevien beetaglukaanien nauttiminen osana ateriaa auttaa vähentämään veren glukoosipitoisuuden kohoamista kyseisen aterian jälkeen” (Euroopan komission asetus [EU] N:o 432/2012).

Beetaglukaanilla on kyky tuoda viskositeettia ja rakennetta nestemäisiin elintarvikkeisiin. Kyseiset reologiset ominaisuudet ovat tärkeitä elintarviketeollisuudessa, juuri fysikaaliset ominaisuudet ovat syynä beetaglukaanin terveysvaikutuksiin eli beetaglukaanin kyky suurentaa viskositeettia ruuansulatuskanavassa. Elintarvike, jossa beetaglukaania on joko luonnostaan tai lisättynä, vaikuttaa siis tuotteen terveysvaikutteisuuteen. Esimerkiksi kolesterolia alentavan vaikutuksen on todistettu olevan vahvimmillaan, kun beetaglukaani

nautitaan juomana (Kivelä ym. 2009, a). Beetaglukaanin rakenne ei ole kuitenkaan pysyvä. Rakenteen hajoamista tapahtuu prosessoinnin ja säilytyksen aikana (Wang 2018). Beetaglukaanin rakenteen pilkkoutuminen voi olla entsymaattista (mm. beetaglukanaasientsyymien aikaansaamaa), mutta sen lisäksi molekyylin rakenteen pilkkoutumista on havaittu myös silloinkin kun entsyymitoiminta on inaktivoitu (Beer ym. 1997).

Beetaglukaanin ei-entsymaattinen, askorbiinihapon aikaansaama pilkkoutuminen on todistettu koeputkiolosuhteissa. Pilkkoutumisen oletetaan tapahtuvan myös kasvisolukossa kasvun ja kypsymisen aikana. Beetaglukaanin ei-entsymaattisesta hajoamisesta erilaisissa matriiseissa tarvitaan lisää tietoa, koska fysiologinen tehokkuus vähenee rakenteen hajoamisen myötä ja samalla terveysväittämien luotettavuus heikkenee (Kivelä ym., 2009). Beetaglukaanin liukenemiseen ja rakenteen hajoamiseen entsymaattisen hajoamisen lisäksi vaikuttavat myös prosessointimenetelmät, jotka elintarvikevalmistajien on ymmärrettävä mahdollisimman suuren beetaglukaanipitoisuuden varmistamiseksi lopputuotteessa (Anttila ym. 2004). Lisäksi muilla makromolekyyleillä ja niiden hapettumisherkkyydellä on merkittävä vaikutus beetaglukaanin pysyvyyteen. Aihetta koskevissa uusimmissa tutkimuksissa on todettu, että hapettuneiden makromolekyylien kuten lipidien lisäksi beetaglukaanin mukana kulkeutuvat yhdisteet kuten mm. jäännösfytaatti voivat vaikuttaa beetaglukaanin hapettumisstabilisuuteen ja siten vaikuttaa beetaglukaanin teknologiseen ja fysiologiseen toiminnallisuuteen (Wang 2018).

Kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli koota tietoa beetaglukaanin pysyvyyteen vaikuttavista tekijöistä. Kirjallisuusosion tavoitteena oli myös beetaglukaanin rakenteen ja reologisten ominaisuuksien kuvaamisen lisäksi selvittää viljamateriaaleista löytyvien makromolekyylien hapettumismekanismeja, koska niillä on merkittävä rooli beetaglukaanin rakenteen pysyvyydessä eri matriiseissa.

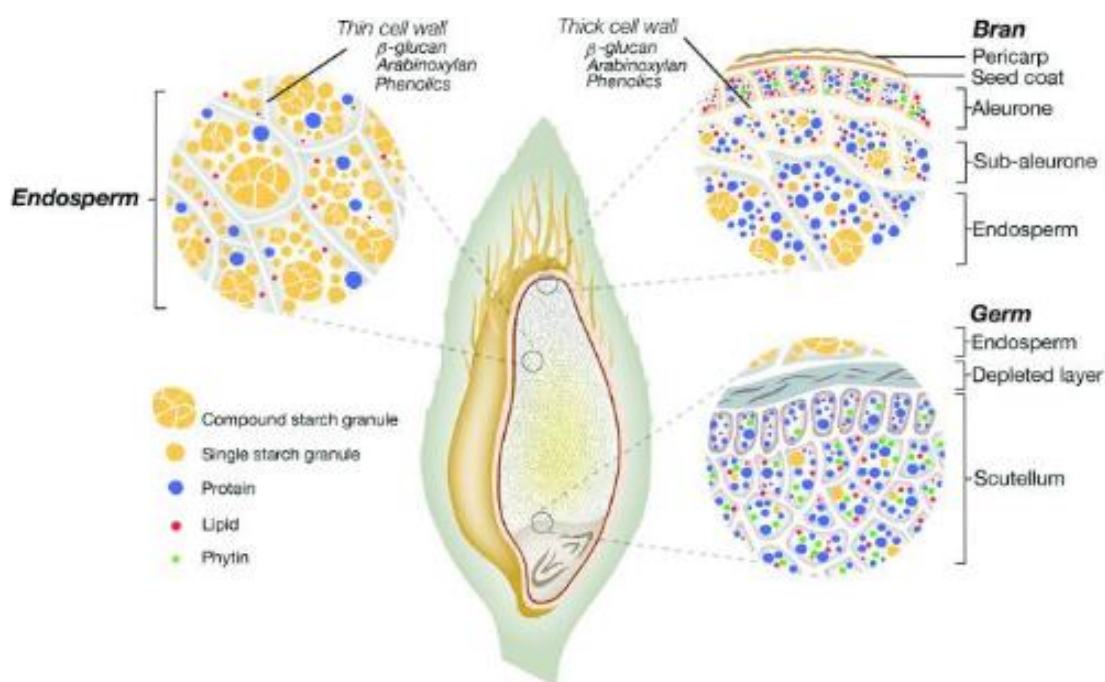
Tutkimuksen kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää kaura- ja ohrautteiden sisältö eri makrokomponenttien osalta sekä löytää selittäviä tekijöitä aikaisemmin samoista näyttemateriaaleista tehtyihin määrittämiin koskien radikaalien muodostusta ja viskositeetin menetystä.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Kaura ja Ohra

2.1.1 Viljan jyvän rakenne

Viljan jyvä koostuu useista yhteen liittyneistä osista. Näitä osia ovat kuorikerrokset, jauhoidin eli endospermi sekä alkio. Jyvän uloimmat kerrokset perikarppi ja jyvän kuori vaikuttavat jyvän liukenemattoman kuidun määrään. Endospermiä ympäröivät subaleuronikerros ja aleuronikerros, joiden tehtävänä on suojata jyvää ja tarjota itämisessä tarvittavia entsyymejä. Tärkkelyspitoinen endospermi toimii jyvän varastokudoksena (Johansson, 2006). Alkio sisältää alkeissilmun ja alkeisjuuren sekä alkiokilven (scutellum) Kuvassa 1 on esimerkkinä jyvän rakenteesta kuvattu ohran jyvän rakenne.



Kuva 1. Ohran jyvän rakenne (Grundy ym. 2018)

2.1.2 Kauran ja ohran jyvän koostumus

Ohran ja kauran jyvän rakenteet eroavat toisistaan. Endospermi, joka on 70 – 80 % jyvän kuivapainosta, sisältää aleuroni- ja subaleuronikerrokset. Lajikkeesta riippuen ohran aleuronikerros on kahdesta neljään solua paksu, kun taas kauralla se on yksikerroksinen

(Dornez ym. 2011). Jyvän aleuronin ja endospermin soluseinien koostumus voi erota myös toisistaan. Esimerkiksi ohran aleuronikerroksessa on arabinoksyylaania 70 %, β -glukaania 26 % ja selluloosaa sekä glukomannaania kumpaakin 2 %. Endospermin soluseinän koostumus poikkeaa β -glukaanin ja arabinoksylaanin kohdalla; β -glukaanin osuus on suurin 75 %, arabinoksyylaania on 20 % (Hayashi 2006).

Rakenteellisten erojen lisäksi myös makromolekyylien pitoisuuksissa on eroja. Ohra sisältää hieman enemmän beetaglukaania kuin kaura; kaura sisältää beetaglukaania n. 1,8–7,9 %, tyypillisin pitoisuus on 4–6 % (Delcour ja Hoseney 2010). Kaura taas puolestaan sisältää enemmän lipidejä ja proteiineja kuin ohra. Suurin osa lipideistä sijaitsee endospermissä (Banas ym. 2007). Ohran jyvä sisältää n. 65–68 % tärkkelystä sekä 1,5–2,5 % mineraaleja, pitoisuuksiin vaikuttaa lajiketyyppi ja viljelyolosuhteet (Baik ja Ullrich, 2008). Taulukossa 1 on esitetty kauran ja ohran jyvän keskimääräisiä pitoisuuksia vaihteluväleineen.

Taulukko 1. Kauran ja ohran kuorellisen jyvän makromolekyylien pitoisuuksia (Baik ja Ullrich 2008; Delcour ja Hoseney 2010)

	Beetaglukaani (%)	Vapaat lipidit (%)	Proteiinit (%)	Ravintokuitu (%)
Kaura	1,8-7,9	3-18	12,4-24,5	10-11
Ohra	2,8-11	2-3	10-17	11-34

Fenolisista yhdisteistä eniten viljoissa esiintyy ferulahappoa. Genotyyppi ja kasvuolosuhteet vaikuttavat myös fenolisten yhdisteiden pitoisuuksiin (Quide-Antell ym. 2006). Fytiinihappopitoisuus viljoissa on 0,14–2,22 % (Wang 2018). Nämä koostumustiedot siis pätevät myös ohraan ja kauraan.

2.1.3 Fytiinihapon rakenne, sijainti jyvässä ja rooli

Fytiinihappo ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) on orgaanisiin fosforiyhdisteisiin kuuluva yhdiste. Rakenteeltaan fytiinihapossa on inositolirengas, johon on liittynyt fosfaattiryhmiä.

Fytiinihappoa on viljoissa ja palkokasveissa. Sillä on merkittävä rooli kasvin metaboliassa esim. siemenen itämisen aikana. Fytiinihapon suolaa fytaattia esiintyy myös kasveissa. Ohrassa ja kaurassa fytaattia on jyvän aleuronikerroksessa, jossa se toimii fosfori- ja mineraalivarastona. Fytaatilla on kyky sitoa itseensä positiivisesti varautuneita kationeja. Fytaatti kykenee sitomaan metalli-ioneja huonosti liukenevaan muotoon eli kelatoimaan niitä. Fytaatti muodostaa kelaatteja muun muassa raudan, sinkin, mangaanin, kalsiumin, kuparin ja magnesiumin ionien kanssa ja saattaa heikentää näiden kivennäisaineiden imeytymistä. Koska fytaatti on assosioitunut leseeseen, on leseeseen kivennäisaine-, fytaatti- ja fosforipitoisuus suurempi kuin kokojyvän. Fytaatti toimii antioksidanttisena yhdisteenä. Fytaatti voi reagoida myös proteiinien ja tärkkelyksen kanssa (Wang 2018).

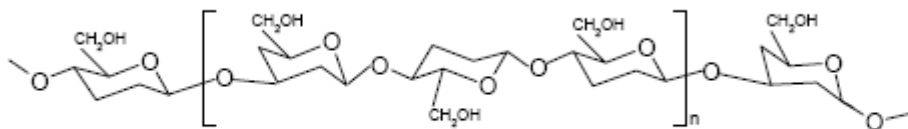
Kaura sisältää fytiinihappoa enemmän kuin ohra. Kauran uutteista löydettyihin korkeampiin fytaattipitoisuuksiin voi vaikuttaa kauran yleinen kuumennuskäsittely (engl. kilning), joka inaktivoi mm. fytaasientsyymiä. Fytaatti on stabiili kuumennuksessa 100 °C:n lämpötilaan saakka. Fytaattia voidaan pilkkoa eli hydrolysoida happohydrolyysillä tai fytaasin vaikutuksella. Hapettavissa olosuhteissa kauran beetaglukaani on stabiilimpi kuin ohran beetaglukaani, sillä kaurapohjaisissa näytteissä voidaan olettaa olevan suurempi pitoisuus fytaattia kuin ohrapohjaisissa näytteissä. Myös kauran beetaglukaani on altistunut oksidatiiviselle pilkkoutumiselle, kun sen sisältämä jäännösfytaatti on poistettu. Myös fytiinihapon lisäys on hidastanut beetaglukaatin pilkkoutumista (Wang 2018).

Fytaasin roolia beetaglukaatin hapettumisessa on tutkittu. Wangin väitöskirjassa mm kauran beetaglukaatin korkeampi jäännösfytaattimäärä oli selittävä tekijä kauran beetaglukaatin oksidatiiviselle stabiilisuudelle. Jäännösfytaatti suojaa beetaglukaania oksidatiiviselta pilkkoutumiselta. Samaisessa tutkimuksessa todettiin, että beetaglukaatin antioksidanttinen aktiivisuus johtuu juuri fytaatista eikä niinkään beetaglukaatin molekyylipainosta ja beetaglukaatin lähteestä (Wang 2018).

2.1.4 Beetaglukaatin rakenne, sijainti jyvässä ja rooli

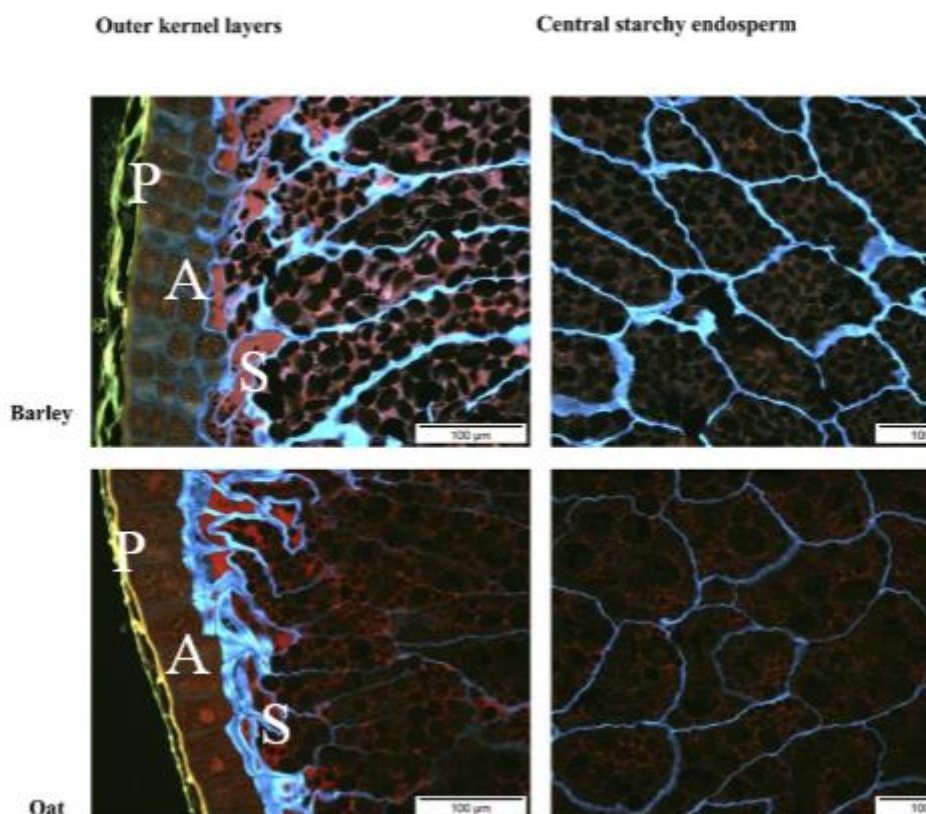
Beetaglukaani on ohran ja kauran soluseinän merkittävä rakennekomponentti.

Beetaglukaani eli (1→3),(1→4)-β-D-glukaani (kuva 2) on lineaarinen polysakkaridi, jonka monosakkaridiyksiköinä on ainoastaan glukoosia. β-glukaanin (1→4)-D-glukopyranosyyliyksiköiden muodostamia sekvenssejä erottaa toisistaan yksittäiset (1→3)-β-glukoosiyksiköt. β-glukaanin liukoisuus perustuu juuri (1→3)-β-glukoosiyksiköihin rakenteessa (Lazaridou ym. 2004).



Kuva 2. β-glukaanin rakenne (Johansson 2006).

Beetaglukaanin rakenteen katsotaan olevan samanlainen sekä kaurassa että ohrassa. (Johansson 2006). Beetaglukaanin sijainnin suhteen kaurassa ja ohrassa on kuitenkin eroja. Kaurassa beetaglukaani on pääasiassa konsentroitunut jyvän fraktioihin suurimman konsentraation ollessa subaleuronikerroksen paksuissa soluseinissä. Ohrassa beetaglukaania taas on tasaisesti jyvän kerroksissa (Wang 2018) (kuva 3).



Kuva 3. Mikroskooppikuva ohran ja kauran jyvien poikkileikkauksista. Vasemmassa rivissä allekkain on esitetty jyvien kuorikerrokset; perikarppi (P), aleuroni (A) ja subaleuroni (S). Oikeassa rivissä allekkain kuvattuna tärkkelysendospermi. Beetaglukaani näkyy kuvissa sinisenä, proteiini punertavan ruskeana ja tärkkelys mustana. Mittajanan pituus 100µm. (Kuva: Dornez ym. 2011).

2.1.5 Beetaglukaenin terveysvaikutukset ja teknologiset ominaisuudet

Ohra ja kaura sisältävät ihmisen terveyttä edistäviä yhdisteitä, kuten ravintokuitua ja antioksidanttisia yhdisteitä. Ravintokuidulla tarkoitetaan ravinnosta saatavia hiilihydraattiyhdisteitä, jotka eivät pilkkoudu ja imeydy ohutsuolessa ja jotka voidaan fermentoida paksusuolessa osittain tai kokonaan. Ravintokuitu sisältää useita erilaisia kasviperäisiä aineita, kuten beetaglukaania, selluloosaa ja arabinoksyalaaneja.

AACC:n (The American Association of Cereal Chemists) määrittelemien kriteerien mukaan kauran ja ohran beetaglukaani on osa ravintokuitua, koska se on resistentti ruuansulatukselle ja absorptiolle ohutsuolessa sekä fermentoituu osittain tai kokonaan paksusuolessa. Beetaglukaanilla on kyky geeliytyä. Beetaglukaenin ominaisuudet vaikuttavat

beetaglukaanin terveyttä edistäviin ominaisuuksiin suotuisasti, kuten veren kolesteroli- ja glukoosiarvoihin (BeMiller 2007).

Beetaglukaanin suotuista vaikutus kolesteroliin, etenkin LDL (engl. low density lipoprotein)-kolesteroliarvoa laskeva vaikutus, on saanut elintarviketeollisuuden kiinnostumaan beetaglukaanin käytöstä luontaisena komponenttina elintarvikkeessa tai lisättynä esimerkiksi välipalatuotteisiin, kuten nestemäisiin välipalajuomiin. Beetaglukaanista ollaan kiinnostuttu myös sen fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien vuoksi. Beetaglukaanin viskositeettia lisäävät ominaisuudet ja potentiaalinen käyttö elintarvikematriisin rakenteen ja tekstuurin sekä ravinnollisten tekijöiden tuojina johtuu yhdisteen reologisista ominaisuuksista (Brennan, 2005). Geelitymis- ja vaahtoutumisominaisuutensa vuoksi se toimii rakennekomponenttina monissa elintarvikkeissa.

Beetaglukaanin ominaisuuksien hyödyntäminen on yleistä viljatuotteissa. Mutta myös maitotaloustuotteissa, kuten vähärasvaisessa jäätelössä ja jogurtituotteissa, beetaglukaania voidaan käyttää yhdessä muun liukoisen kuidun kanssa antamaan lopputuotteelle rasvaisempi suutuntuma, aistiominaisuudet kun muistuttavat enemmän täyteläisen rakenteen vuoksi rasvaisempia tuotteita (Brennan 2005). Ominaisuudet, jotka luovat elintarvikkeisiin näitä toivottuja ominaisuuksia, johtuvat beetaglukaanin geelitymisominaisuuksista ja niiden kyvystä muodostaa hyvin strukturoituja ja elastisia kaseiini-proteiini-glukaanimatriiseja (Brennan 2005).

Kauran ja ohran beetaglukaanilla on kuitenkin eroja, jotka vaikuttavat teknologisiin ominaisuuksiin. Tällaisia ominaisuuksia ovat mm. DP3:DP4-suhdeluku, joka vaikuttaa geelitymisominaisuuksiin. Taulukossa kolme on vertailua beetaglukaanista kaurassa ja ohrassa (taulukko 3).

Taulukko 3. Beetaglukaani kaurassa ja ohrassa. (Delcour ja Hoseney 2010; Izydorczyk ja Dexter, 2008; Johansson ym. 2004; Wang 2018)

vilja	beetaglukaani- nipitoisuus (%)	sijainti jyvässä	uuttuvuus	DP3:DP4 - suhdeluku	muodon säännöllisyys	viskosi- teetti	hapettumis- stabiilisuus
kaura	n. 2-8	pääasiassa jyvä fraktioissa	parempi kaurassa				parempi kaurassa -> mm. fytaattipit. vaikuttaa
ohra	n. 3-11	aleuroni- ja endospermi- kerroksissa		korkeampi -> geeliytymis- kyky ja vahvempi rakenne ohrassa	säännöllisempi -> ohra paremmin geeliytyvä	suurempi ohralla	

Erityisesti kauran kiinnostavuus erityyppisissä elintarvikkeissa on kasvanut viime vuosina. Gluteenittomana viljana kaura soveltuu monen ruokavalioon. Myös elintarviketeollisuus on kiinnostunut kaurapohjaisista tuotteista. Kaurapohjaisten tuotteiden käyttö maitoa korvaavina tuotteina (kaurajuomat, jogurtit) on lisääntynyt merkittävästi lisääntyneen tuotteistuksen myötä. Lisäksi kaurapohjaisia tuotteita on viime vuosina kehitetty maitotaloustuotteiden korvaamisen lisäksi myös proteiinin lähteiksi ravitsemukseen, tästä esimerkkinä nyhtökauratuotteet. Lisäksi uusia kaurainnovaatioita kehitetään niin elintarvikekäyttöön (juomat, viljatuotteet, jäätelöt) kuin muun teollisuuden käyttöön (beetaglukaanikonsentraatit, kauraproteiini, kauraöljy) sekä myös rehukäyttöön.

Keskon tuottamassa Ruokatrendit 2019 -raportissa kiinnostavimpina tuotteina kuluttajien ostoskorilistalle nousivat ensimmäistä kertaa kaurapohjaisista tuotteista kauramaito ja kauramaidosta valmistetut elintarvikkeet, kun tutkimukseen osallistuvilta henkilöiltä kysyttiin mm., mitä tuotteita ja raaka-aineita he uskovat käyttävänsä enemmän vuonna 2019 (Kesko 2018). Kaurapohjaisten tuotteiden suosio on siis varmasti kasvussa edelleen. Ohrapohjaisissa tuotteissa ei vastaavaa trendiä ole havaittu.

2.2 Hapettuminen kasvimateriaalissa

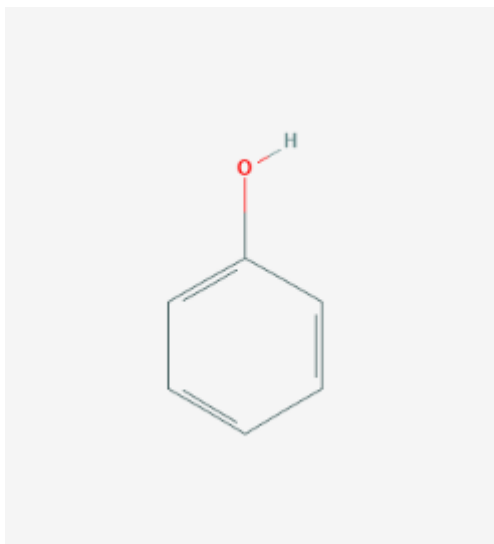
Entsyyattiset ja ei-entsyyattiset reaktiot vaikuttavat soluseinän polysakkareihin mm. hajottamalla niiden rakennetta. Tässä hapettumista koskevassa osiossa keskitytään ei-entsyyattiseen hapettumiseen. Ei-entsyyattisia tekijöitä on aktiivisten happiradikaalien lisäksi myös metalli-katalysoitu hapettuminen. Metallionien katalysoimasta hapettumisesta on esimerkki Fenton-reaktio, josta kerrotaan kappaleessa 2.1 tarkemmin.

Hapettumisella tarkoitetaan reaktiota, jossa tapahtuu elektroninsiirtoja. Kun atomi hapettuu se luovuttaa elektronin. Hapettumista ei voi tapahtua ilman pelkistymistä, samalla kun aine hapettuu, toinen aine pelkistyy. Kyse on siis aineiden välisestä elektronien luovuttamisesta ja vastaanottamisesta. Useammat aineet voivat toimia sekä hapettimina että pelkistiminä (Laitinen ym. 1982).

Kasvisolut tuottavat aktiivista happea mm. ollessaan tekemisissä potentiaalisten patogeeneiden kanssa. Aktiivisella hapella on antimikrobiaalinen vaikutus. Sillä on myös vaikutus muissa kasvin puolustusmekanismeissa, kuten lipidien peroksidaatiossa. Aktiivinen happi viittaa happimuotoihin, joita muodostuu, kun molekulaarinen happi (O_2) pelkistyy (Baker ja Orlandi 1995). Myös hapettumisreaktioissa tarvittavia yhdisteitä on usein valmiina kasvimateriaalissa, kuten esimerkiksi vetyperoksidia sekä siirtymämetalleja (Fry 2004).

Kasvimateriaalissa on luonnostaan askorbiinihappoa, joka toimii pääosin hapettumista estävänä tekijänä. Muita hapettumista estäviä yhdisteitä ovat metalleja sitovat yhdisteet, kuten fenoliset yhdisteet ja fytinihappo. Kelatoiva vaikutus perustuu sopivan orientaation omaavien funktionaalisten ryhmien saatavuuteen. Näin ollen kaikki polyfenolit eivät välttämättä sido metalleja. Yhden sidoksen muodostava ligandi on heikompi metallinsitoja kuin kaksi sidosta muodostava ligandi.

Fenolit (esimerkki kuvassa 4) ovat orgaanisia yhdisteitä, joissa yksi tai useampi hydroksyyli-ryhmä ($-OH$) on liittynyt suoraan bentseenirenkaaseen. Kun fenolinen ryhmä on konjugoitu hiilihydraattiryhmään, kuten kasveissa esiintyvissä fenolisissa glykosideissa, se ei voi enää sitoa metalleja (Wong ym. 2006) eikä toimia hapettumista estävänä tekijänä.



Kuva 4. Fenoli eli hydroksibentseeni muodostuu bentseenirenkaasta ja siihen liittyneestä hydroksyyli-ryhmästä. (National Center for Biotechnology Information 2020).

2.2.1 Metalli-ionit kasvimateriaalissa ja niiden merkitys hapen reaktioissa

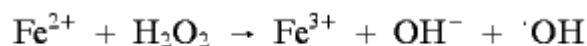
Kasvimateriaali sisältää luontaisesti kivennäisaineita. Kauran ja ohran jyvät sisältävät monia kivennäisaineita. Kivennäisaineista eniten kauran ja ohran jyvissä on kaliumia ja fosforia. Taulukossa 4 on kuvattu tyypillisiä arvoja ja vaihteluvälejä kauran jyvän mineraalipitoisuuksista (mg/100 g).

Taulukko 4. Kauran jyvän mineraalipitoisuuksia (Dendy ja Dobraszczyk, 2001).

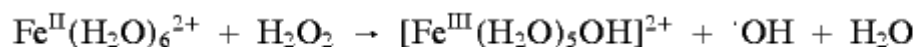
Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn	Mn
12	450	75	140	370	10	0.76	4.0	7.5
(2-77)	(310-650)	(41-180)	(100-180)	(290-590)	(5-30)	(0,30-1,5)	(2,1-7,0)	(2,2-20)

Kauran ja ohran jyvät sisältävät myös siirtymämetalleja. Siirtymämetallien atomeissa on toiseksi uloimmalla elektronikuorella vajaasti täytetty d-orbitaali. Siirtymämetallit osallistuvat hapettumisreaktioihin. Siirtymämetallien katalysoimaa radikaalien muodostusreaktioita kutsutaan Fenton-reaktioiksi. Fenton-reaktiossa hydroksyyli-radikaali syntyy vetyperoksidin ja ferroraudan (Fe^{2+}) välisessä reaktiossa.

Reaktio 1



Reaktio 2



Ylempi reaktio kuvaa klassista Fenton mekanismia (reaktio 1). Kummassakin tapauksessa (reaktio 1 ja reaktio 2) vetyperoksidi pelkistyy ja syntyy vapaa hydroksyyli-radikaali. Samalla ferrorauta hapettuu ferriraudaksi ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) (Lloyd ym. 1997). Fenton-reaktio tarvitsee tapahtuakseen vetyperoksidia ja siirtymämetallin. Muukin metalli-ioni kuin rauta voi toimia reaktiossa pelkistimenä. Esimerkiksi kupari on 60 kertaa tehokkaampi pelkistin kuin rauta (Fry, 2004). Alla (reaktio 3) esimerkkireaktio kuparin ja vetyperoksidin välisestä reaktiosta.

Reaktio 3



Fenton-reaktion ominaispiirre liittyy pelkistävien metallien katalyyttiseen luonteeseen, ne voivat tuottaa reaktiivisia hydroksyyli-radikaaleja vähemmän reaktiivisesta vetyperoksidista. Pelkistävä tekijä tarvitaan pelkistämään katalysoiva metalli aktiiviseen tilaan. Beetaglukaanin tiedetään muodostavan komplekseja metallien kanssa, mikä tekee siitä spesifin kohteen OH-radikaalikäynnisteiselle hajoamiselle (Kivelä ym. 2009).

Kaikkia Fenton-reaktiossa tarvittavia reagensseja on valmiiksi vesi-viljamatriiseissa: liuennutta happea, siirtymämetalleja sekä pelkistäviä yhdisteitä. Eräs usein viljamatriiseissa oleva erinomainen pelkistäjä on askorbiinihappo. Se voi toimia sekä pro-oksianttina eli hapettumista edistävänä tekijänä että antioksidanttina riippuen sen konsentraatiosta.

Askorbiinihappo käy hapettuessaan läpi kaksi vaihetta: ensin muodostuu dehydroaskorbiinihappoa ja lopuksi askorbaattiradikaali. Dehydroaskorbiinihappo voi osallistua myös β -glukaanin rakenteen hajottamiseen. Muita beetaglukaanin rakennetta hajottavia tekijöitä Fenton reaktion lisäksi ovat reaktiiviset happiradikaalit (ROS = reactive oxygen species) (Kivelä ym. 2009) sekä fenoliset yhdisteet, kuten ferulahappo, jolla on myös melko korkea pelkistyspotentiaali ja joka voi toimia hapettumista edistävänä tekijänä tietyissä nestemäisissä olosuhteissa (Kivelä ym. 2009 a). Fenolisten yhdisteiden ja askorbiinihapon pro-oksiantti- tai antioksidanttiluonne riippuu siis niiden pitoisuuksista.

2.2.2 Makromolekyylien hapettuminen

Makromolekyyleillä tarkoitetaan tässä niitä suurimpia molekyylejä, jotka ovat jauho-vesimatriisissa muodostamassa näyteainesta. Lipidit, proteiinit ja hiilihydraatit kuuluvat tähän joukkoon.

2.2.3 Lipidien hapettuminen

Viljassa esiintyvät lipidit voidaan jakaa poolittomiin ja polaarisiin lipideihin. Poolittomat eli varauksettomat lipidit koostuvat pääosin triasyyliglyseroleista. Poolittomiin lipideihin kuuluvat myös vapaat rasvahapot sekä di- ja monoasyyliglyserolit. Polaariset eli varaukselliset lipidit koostuvat glyko- ja fosfolipideistä.

Lipidien hapettuminen on useasta kemiallisesta reaktiosta koostuva sarja. Herkimmin hapettuvat monityydyttymättömät rasvahapot, joissa on useampi kuin yksi kaksoissidos. Tyydyttymätön rasvahappo voi hapettua mm. metalli-ionin tai lämmön katalysoimana (autoksidaatio) tai UV-valon ja näkyvän valon katalysoimana (foto-oksidaatio) (Min 1998). Lipidien hapettumisprosessissa keskeinen tekijä on vapaat radikaalit. Siksi tässä lipidien hapettumista koskevassa osiossa paneudutaan lipidien autoksidaatiomekanismiin.

Autoksidaatioon kuuluu kolme vaihetta; initiaatio, propagaatio ja terminaatio. (McClements ja Decker 2008). Autoksidaatiossa rasvahapon (RH) hajotessa vetyatomi irtaana hiilivetyrungosta ja muodostuu alkyyliradikaali ($R\bullet$) (reaktio 4), joka reagoi välittömästi hapen kanssa, jolloin muodostuu peroksyyliradikaali ($ROO\bullet$) (reaktio 5). Tämä on esimerkki propagaatiovaiheen reaktiosta. Peroksyyliradikaali edelleen sieppaa vedyn rasvahapolta, jolloin muodostuu hydroperoksi ($ROOH$) ja uusi alkyyliradikaali (reaktio 6), joka edelleen voi reagoida nopeasti hapen kanssa ja jatkaa hapetusreaktiota. Propagaatiovaiheen esimerkkejä on muitakin, mutta tässä kuvatusti muutamia propagaation esimerkkireaktioita (Min 1998).

Autoksidaation vaihteita:

Reaktio 4



Reaktio 5



Reaktio 6



Radikaalit voivat reagoida myös keskenään, jolloin kaksi rasvahapporadikaalia muodostaa ei-radikaaleja, näin hapettuminen pysähtyy ja ketjureaktio katkeaa eli kyseessä on terminaatioreaktio, josta alla muutamia esimerkkejä (reaktiot 7–9) (Min 1998).

Autoksidaation vaiheita:

Reaktio 7



Reaktio 8



Reaktio 9



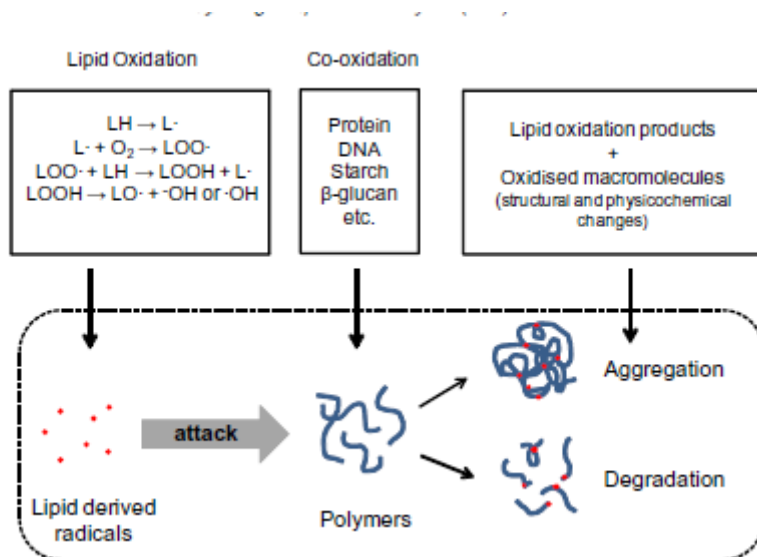
Terminaatioreaktiot voivat tapahtua pääasiassa neljällä eri mekanismilla: radikaalien uudelleenliittymisillä (reaktiot 7–9), alkoksyyli-radikaalien alfa- ja betalohkeamisilla, muiden kuin lipidien hapettumisella (kuten proteiinit) tai hapettumista kiihdyttävien molekyyli-ryhmien eliminoinnilla (Schaich ym. 2013).

Foto-oksidaatio tapahtuu näkyvän valon vaikutuksesta valoherkistimen läsnä ollessa. Rasvahaposta muodostuu joko fotonin tuottama radikaali, joka yhdessä hapen kanssa muodostaa hydroperoksidin tai valoherkistin reagoi hapen kanssa muodostaen reaktiivisen singlettihapen, joka reagoidessaan rasvahapon kanssa muodostaa hydroperoksidin.

Lipidien hapettuminen voi vaikuttaa myös beeta-glukanin rakenteeseen. Wang ym. (2016) ovat tutkineet beeta-glukanin rakenteen pysyvyyttä vesi-öljymalleissa ja todenneet, että lipidien hapettuminen aiheutti beeta-glukanin hajoamista etenkin raudan läsnä ollessa emulsioissa. Lipidien hapettuminen saatiin aikaan nostamalla lämpötilaa ja lisäämällä rautaa Fe(II), mikä puolestaan lisäsi beeta-glukanin hajoamista. Tällä kokeella haluttiin mallintaa

elintarvikkeiden monifaasisia systeemejä, joissa sekä lipidejä että beetaglukaania on läsnä. (Wang ym. 2016).

Kuvassa 5 on selitetty lipidiradikaalien aiheuttama muiden polymeerien hapettuminen ja hapettumisen aiheuttamat muutokset, esimerkiksi beetaglukaanin degradaatio eli pilkkoutuminen ja aggregoituminen eli saostuminen.



Kuva 5. Lipidiradikaalien aiheuttama muiden polymeerien hapettuminen ja hapettumisen aiheuttamat muutokset (Wang ym. 2016).

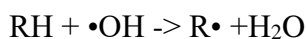
2.2.4 Hiilihydraattien hapettuminen

Suurin osa viljajyvien hiilihydraateista on tärkkelystä. Toiseksi suurimman osan hiilihydraateista muodostavat ei-tärkkelysperäiset polysakkaridit kuten arabinoksyylaani, beetaglukaani ja selluloosa. Pieni osa hiilihydraateista on mono- ja dimeerisiä sokereita, kuten glukoosia, fruktoosia ja sakkaroosia. Suuria vaihteluja kuitenkin esiintyy eri viljojen ja viljalajikkeiden välillä ja eri kasvuolosuhteista johtuen (Holtekjølén ym. 2006).

Hapettumisreaktioiden kannalta olennaisia rakenteita hiilihydraateissa ovat hydroksyyliiryhmät, jotka ovat alttiita reaktioille. Myös karbonyyliiryhmät ovat hapettumiselle alttiita ryhmiä (Huber ja BeMiller 2017).

Esimerkki hiilihydraattien hapettumisesta on hiiliatomiin sidotun vedyn irtoaminen joka aiheuttaa hiilihydraattiradikaalin syntymisen (reaktio 10).

Reaktio 10



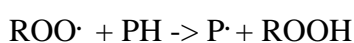
Kauran beetaglukaanin on todistettu olevan vähemmän altis hapettumiselle kuin ohran beetaglukaani. Tätä löydöstä on selittänyt ohra- ja kauranäytteiden fytiinihappopitoisuus. Kauranäytteissä on todettu olleen fytiinihappoa ja siten jäännösfytaattia enemmän (Wang 2018).

2.2.5 Proteiinien hapettuminen

Viljoissa esiintyviä proteiineja ovat albumiinit, globuliinit, prolamiinit ja gluteliinit. Viljojen proteiineja voidaan luokitella niiden liukoisuuden mukaan (Osborne, 1924). Albumiinit liukenevat veteen, globuliinit suolaliuokseen, prolamiinit 70-prosenttiseen etanoliin ja gluteliinit liukenevat osittain happoihin tai emäksiin. Liukeneminen on mahdollista vain disulfidisidosten pelkistämisen jälkeen. Kyseisistä proteiineista prolamiinit esiintyvät pääasiassa endospermin varastoproteiineina kun taas albumiinit sijaitsevat aleuronikerroksessa ja toimivat entsyymeinä jyvän itämisen alkuvaiheessa (Shewry 1993).

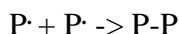
Proteiinien hapettuminen voi tapahtua joko radikaalivälitteisesti tai niiden hapettuminen voi saada alkunsa muiden makromolekyylien hapettumistuotteista. Esimerkiksi rasvojen hapettumisessa muodostuvat primääriset hapettumistuotteet, hydroperoksidit, sekä sekundääriset hapettumistuotteet, kuten aldehydit ja ketonit, voivat aiheuttaa myös proteiinien hapettumista. Radikaalivälitteisessä proteiinien hapettumisessa peroksyyliradikaali ($ROO\bullet$), joka on muodostunut lipidien hapettumistuotteena, voi siepata vetyatomeita proteiinimolekyyleistä (PH) (reaktio 11):

Reaktio 11



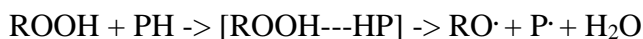
Muodostuneet proteiiniradikaalit ($P\bullet$) voivat reagoidessaan muodostaa ristsidosten kautta proteiiniverkostoja (P-P) (reaktio 12).

Reaktio 12



On myös esitetty, että proteiinien hapettumisprosessi voi tapahtua ei-kovalenttisen kompleksin muodostuksen kautta sekä elektrostaattisten että hydrofobisten vuorovaikutusten (vetovoimien) kautta. Vuorovaikutukset voivat tapahtua lipidien hydroperoksidien tai lipidien sekundaaristen hapettumistuotteiden (aldehydit ja ketonit) ja proteiinien reaktiivisten aminohappotähteiden (typpi- tai rikkikeskusten) kanssa (reaktio 13) (Viljanen 2005).

Reaktio 13



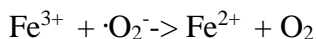
Proteiini, jolla on kahdenarvoinen kationin sitomiskohta, voi aiheuttaa metallikatalysoidun hapettumisen. Metalleista rauta ja kupari voivat hapettaa erityisesti proliini- ja arginiinihappotähteitä. Reaktiossa muodostuvat radikaalit voivat reagoida hapen kanssa muodostaen tryptofaaniperoksyyliradikaaleja. Nämä voivat puolestaan reagoida lipidien kanssa johtaen lipidien hapettumiseen (Viljanen 2005).

2.2.6 Aktiivinen happi

Molekulaarinen happi (O_2) on itsessään suhteellisen ei-reaktiivinen, mutta se voi muuttua reaktiiviseksi, kun sen elektronirakenne muuttuu. Pelkistyminen saa aikaan molekulaarisen hapen muuttumisen superoksidianioniradikaaliksi (O_2^-). Biologisissa systeemeissä reaktion kofaktorina toimii koentsyymi NAD(P)H (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti). Seuraavissa vaiheissa superoksidiradikaali pelkistyy vetyperoksidiksi (H_2O_2), hydroksyyiliradikaaliksi ($OH\cdot$) ja lopulta vedeksi. Vetyperoksidi on voimakkaasti hapettava aine ja vastoin muita aktiivisia happilajeja solukalvojen osana. Se voi hapettaa siirtymämetalleja, kuten ferrorautaa (Fe^{2+}), tai orgaanisia molekyylejä (Baker ja Orlandi 1995).

Hydroksyyliiradikaalien uskotaan muodostuvat Haber-Weiss-reaktion kautta (reaktio 14).

Reaktio 14



Koska siirtymämetallit toimivat reaktiossa katalyytteinä, hydroksyyliiradikaalin muodostumispaikan määrää metalli-ionikompleksien sijainti soluseinässä. Hydroksyyliiradikaalin puoliintumisaika on mikrosekuntien luokkaa ja siksi se reagoi lähellä olevien materiaalien kanssa (Baker ja Orlandi 1995). Kasvien solukomponenteista aktiivisten happimuotojen tuottamille vapaille radikaaleille ja niiden haitallisille vaikutuksille ovat alttiita proteiinien ja lipidien lisäksi myös hiilihydraatit, joiden rakennetta reaktiiviset happiradikaalit hajottavat (Blokina ym. 2003).

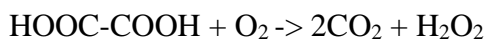
2.2.7 Vetyperoksidin muodostuminen ja lähteet

Vetyperoksidi on hapettaja ja se voi hapettaa siirtymämetalleja tai orgaanisia molekyylejä. Vetyperoksidia muodostuu kasvin kasvuvaiheessa ja se esiintyy soluseinän rakennekomponenttina. Vetyperoksidin roolia soluseinässä on luonnehdittu kaksijakoiseksi: toisaalta se tiukentaa soluseinää muodostamalla ristsidoksia ja toisaalta inaktivoi soluseinän proteiineja, jotka voivat olla osallisia katalysoimassa nestepaineen ajamaa solulaajenemista. Myös ligniinisynteesin yhteydessä muodostuu vetyperoksidia (Vreeburg ja Fry 2005).

Edellä mainittujen tekijöiden lisäksi kasvin mekaaninen vahingoittuminen ja mikrobiologiset tekijät lisäävät vetyperoksidin tuottoa. Tämä on kasvin keino taistella patogeeneja vastaan (Vreeburg ja Fry 2005).

Kasvi tuottaa vetyperoksidia entsyymitoiminnan seurauksena esimerkiksi viljan jyvän itämisen aikana (reaktio 15). Oksidaasit käyttävät molekulääristä happea elektroniakseptoreina eli elektronin vastaanottajina ja tuottavat vetyperoksidia lopputuotteena. Esimerkiksi viljojen soluseinällä on oksalaattioksideasia, joka katalysoi vetyperoksidin tuottoa.

Reaktio 15



Hydroksyyliiradikaali ($\cdot\text{OH}$) on kaikkein reaktiivisin reaktiivisista hapettumisradikaaleista ja siksi tehokas hapettumisreaktioiden aikaansaaja. Elintarvikkeissa myös lipidien hapettuminen saa aikaan radikaaleja initiaatio- ja propagaatiovaiheissa. Lipidialkyyliiradikaali (L), joka muodostuu tyydyttymättömistä lipideistä (LH), voi reagoida hapen kanssa muodostaen reaktiivisia hydroperoksiedeja (LOOH). Jopa pienet määrät voivat johtaa merkittävään hapettumisreaktioon siirtymämetallien läsnä ollessa. Radikaalien läsnäolo voi vaikuttaa myös proteiinien hapettumiseen. Kaikki nämä reaktiot vaikuttavat makromolekyylien välisien ristsidosten muodostumiseen, hajoamiseen ja muutoksiin rakenteessa.

2.2.8 Hapettumiselta suojaavat tekijät

Kelatoivia yhdisteitä eli metalleja sitovia aineita voivat olla luonnolliset aineet, kuten karboksyylihapot tai aminohapot ja peptidit. Aiemmin käsitelty fytaatti on myös esimerkki viljamateriaalissa luonnostaan olevasta kelatoivasta yhdisteestä. Teollisuus käyttää myös kelatoivia yhdisteitä, kuten EDTA:ta lisäämään antioksidanttista tehokkuutta ja estämään hapettumisreaktioita. EDTA sitoo tehokkaimmin siirtymämetalleja, kuten kupari-ioneja (Cu^{2+}) ja ferrorautaa (Fe^{2+}) (Berlitz ym. 2004).

Antioksidantit suojaavat hapettumiselta reagoidessaan itse vapaiden radikaalien kanssa. Fenoliset yhdisteet voivat toimia kemiallisen rakenteensa vuoksi hapettumiselta suojaavina yhdisteinä. Antioksidanttien rooli voi kuitenkin olla myös käänteinen riippuen olosuhteista. Tiedetyt antioksidantit, kuten askorbiinihappo, voivat pelkistyskykynsä takia myös edistää hapettumista – askorbiinihappo on pro-oksiantti pienissä pitoisuuksissa.

2.2.8.1 Kelaattorit

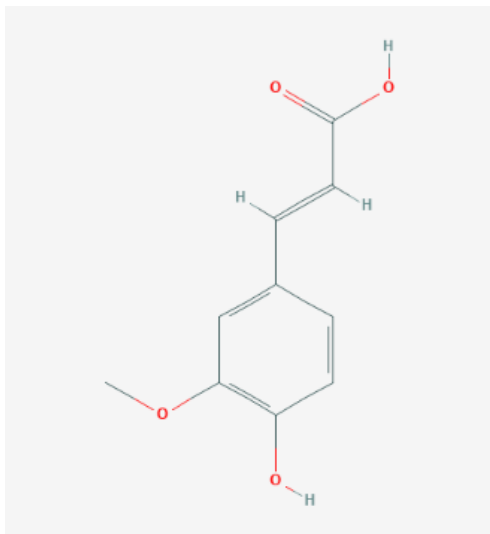
Kelaattorit ovat yhdisteitä, jotka kykenevät sitoutumaan metalli-ioneihin. Kelaattorit voivat toimia sekä antioksidanteina estäen hapettumisesta johtuvaa yhdisteiden hajoamista että rakennetta hajottavina tekijöinä. Metallin ja kelaattorin muodostamaa yhdistelmää kutsutaan kelaatiksi. Luonnostaan esiintyviä kelaattoreita ovat esimerkiksi sitraatti ja oksalaatti, jotka voivat sitoa kalsium-ioneja (Ca^{2+}) ja irrottaa pektiiniin sitoutunutta kalsiumia altistaen pektiinin hajoamiselle (Fry, 2004). Viljassa luontaisesti esiintyvä fytaatti voi toimia kelaattorina, jolloin esimerkiksi vetyperoksidin reaktio raudan kanssa estyy. Kelaattorit voivat toimia siis antioksidanteina sitoen metalli-ioneja, jotka muutoin osallistuisivat Fenton reaktioon estäen näin Fentoa reaktion synnyn (Liyana-Pathirana ja Shahidi 2006). Kelaattorina toimivan yhdisteen sijainti, suunta ja muut vuorovaikutukset vaikuttavat sitomiskykyyn.

2.2.8.2 Fenoliset yhdisteet

Fenoliset yhdisteet ovat kasvien sekundaarisia metaboliitteja, joita kasvit syntetisoivat normaalin kasvun tuloksena sekä stressin vaikutuksesta, jota kasvitaudit, UV-säteily, kasvikudoksen vahingoittuminen jne. aiheuttavat. Fenoliset yhdisteet ovat monipuolinen joukko fytokemikaaleja, jotka ovat peräisin fenyylialaniinista ja tyrosiinista. Kasveissa fenolisia yhdisteitä voi esiintyä mm. yksinkertaisina fenoleina, fenolisina happoina, kumariineina, flavonoideina, stilbeeneinä, lignaaneina, lingniineinä ja tanniineina.

Liukenemattomat fenoliset yhdisteet esiintyvät kasveissa soluseinissä. Liukoiset fenoliset yhdisteet taas esiintyvät kasvisolurakkuloissa. Kasvien uloimmat kerrokset sisältävät enemmän fenolisia yhdisteitä kuin sisemmät osat. Soluseinän fenolit, jotka liittyvät muihin solun aineosiin, vaikuttavat soluseinien mekaaniseen vahvuuteen ja säätelevät kasvin kasvua ja morfogeneesiä. Ne esiintyvät solussa myös reaktiona stressiin ja patogeeneihin (Naczki ja Shahidi 2006).

Fenolisten yhdisteiden pitoisuuteen vaikuttaa genotyyppi sekä se, onko kasvimateriaalissa mukana jyvän kuori, jossa on huomattavasti enemmän fenolisia yhdisteitä, etenkin *p*-kumariinia. Kaurassa ja ohrassa on fenolisista yhdisteistä eniten ferulahappoa (kuva 6). Muita merkittäviä fenolisia yhdisteitä on kahvihappo sekä *p*-kumariini (Quide-Antell ym. 2006). Nämä kuuluvat hydroksikanelihappoihin, ne ovat kanelihapon johdoksia.



Kuva 6. Ferulahapon rakenne. (National Center for Biotechnology Information 2020). PubChem Compound Summary for CID 445858, Ferulic acid. Retrieved November 10, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>.

Fenoliset yhdisteet voivat toimia antioksidanteina. Fenolisten yhdisteiden antioksidanttimekanismi perustuu vedyn luovutukseen radikaalille fenolisestä hydroksyyli ryhmästä. Fenolisten yhdisteiden hapettumiselta suojaava vaikutus perustuu siis yhdisteen kemialliseen rakenteeseen (Taleva-Naakka 2007).

Fenoliset yhdisteet ja beetaglukaani voivat myös reagoida keskenään. Simonsen ym. (2009) vahvistivat tutkimuksessaan, että kauran ja ohran beetaglukaani voi sitoa fenolisia yhdisteitä fysiologisissa olosuhteissa. Beetaglukaenin kyky sitoa yhdisteitä saattaa liittyä hydrofobiseen sitoutumiseen ja polymeerin misellien sitomiskykyyn. Beetaglukaenin kyky sitoa fenolisia yhdisteitä ei säilynyt kaikilta osin, jos beetaglukaenin rakenne hajosi, esim. enstyyminvälitteisen hajoamisen vaikutuksesta fenolisten yhdisteiden sitomiskyky heikkeni (Simonsen ym. 2009).

Viljojen jyvän sisältämät fenoliset yhdisteet voivat estää vapaiden radikaalien muodostusta. Ragaeen ym. (2006) tutkimuksessa saatiin korrelaatioita radikaaliensieppausaktivaation ja fenolisten yhdisteiden pitoisuuden välillä ohran ja kauran kokojyvä- ja jyväfraktioissa. Tulosten perusteella voidaan olettaa, että fenoliset yhdisteet voivat estää radikaalinmuodostusta myös elimistössä (Ragae ym. 2006).

2.3 Ohran ja kauran beetaglukaanin eristäminen ja reologia

2.3.1 Beetaglukaanin eristäminen viljamateriaalista

Beetaglukaanin eristämisen vaiheisiin kuuluvat endogeenisten entsyymien inaktivointi, beetaglukaanin uuttaminen ja saostaminen. Endogeeniset β -glukanaasientsyymit pitää inaktivoida, koska ne aiheuttavat beetaglukaanin rakenteen hajoamista, joka puolestaan johtaa molekyylipainon pienenemiseen ja sitä kautta toiminnallisten ominaisuuksien muutoksiin, kuten viskositeetin vähenemiseen (Brennan 2005).

Beetaglukaani voidaan eristää viljajauhosta erilaisilla uuttomenetelmillä. Uuttamisessa käytettyjä menetelmiä ovat kuumavesiuutto, entsymaattinen uutto, liuotinuutto ja emäsuutto. Myös uuttamismenetelmien yhdistämistä voidaan käyttää, esim. kuumavesiuuttoa ja α -amylaasientsyymiä käytetään optimoimaan beetaglukaanin puhtaus ja minimoimaan tärkkelyksen aiheuttama kontaminaatio (Ahmad ym. 2009). Kuumavesiuutto on edullinen ja se sopii hyvin käytettäväksi menetelmäksi elintarviketeollisuudessa (Ahmad ym. 2009).

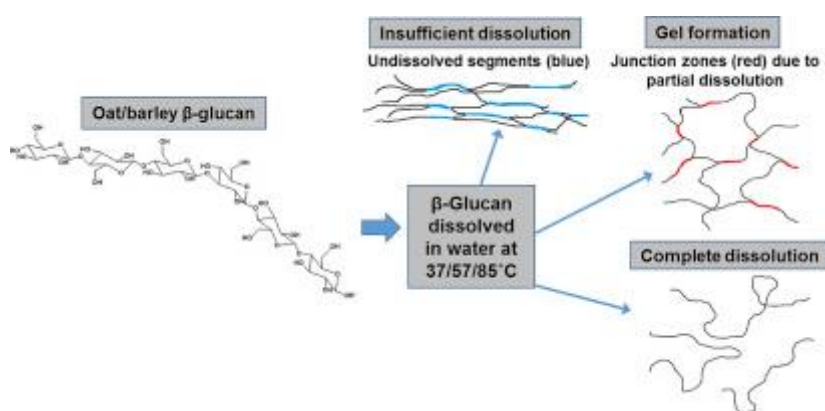
Kuumavesiuuttoon kuuluu monta työvaihetta. Ensin jauhot sekoitetaan veden kanssa ja laitetaan 40–50 °C:teen lämpötilaan ravisteluun inkuboitumaan. Inkuboinnin jälkeen uuttuneet ja uuttumattomat materiaalit erotetaan toisistaan sentrifugoimalla. Lämpökäsittely ja sentrifugointi toistetaan 2–3 kertaa ja saadut supernatantit (näyteliuos) kerätään näyteputkeen ja pakastetaan myöhempiä analyysejä varten (Saulnier ym. 1994).

2.3.2 Beetaglukaani vesiliuoksessa

Beetaglukaanin muodostamat polymeeriketjut ovat rakenteeltaan joustavia, niiden muoto vaihtelee nesteessä lämpöliikkeen seurauksena (Brownin liike). Beetaglukaani muodostaa vesiliuoksessa molekyyliverkoston, jolloin liuoksen viskositeetti kasvaa ja rakenne muuttuu geelimäiseksi. Viskositeetin kasvu perustuu beetaglukaanimolekyylien vuorovaikutuksen lisääntymiseen toistensa kanssa ja lopulta kiinnittymiseen toisiinsa tietyssä pitoisuudessa (kriittinen pitoisuus). Konsentraation kasvattaminen aiheuttaa polymeerien kietoutumista, jolloin syntyy polymeerien muodostama molekyyliverkosto, joka kasvattaa liuoksen leikkausvoimaa ja lisää siten viskositeettia. Syntynyt geeli on viskoelastinen systeemi, joka

muodostuu kiinteästä elastisesta osasta (polymeerit) ja virtaavasta viskoosista osasta (vapaa ja sitoutunut vesi) (Hoffman 2002). Geeliytymiseen vaikuttaa molekyyl koko, konsentraatio ja lämpötila. Kasvava konsentraatio ja lämpötila (25–35°C) lisäävät geeliytymistä. Korkeammissa lämpötiloissa geeliytyminen vähenee. Viskoosin geelimäisen rakenteen muodostumiseen vaikuttaa myös edullisesti pieni molekyyl koko sekä molekyyl ketjun rakenne: mitä suurempi on beetaglukaanin DP3:DP4- suhde beetaglukaaniketjussa, sitä nopeammin geeliytyminen tapahtuu (Lazaridou ym. 2007). DP3:DP4- suhde viittaa beetaglukaanin hydrolyysituotteina syntyviin oligosakkarideihin; 3-O- β -sellobiosyyli-D-glukoosiin ja 3-O- β -sellotriosyyli-D-glukoosiin (Johansson 2006).

Ohran ja kauran beetaglukaani geeliytyy myös alhaisissa konsentraatioissa (1-1,5-prosenttisissa liuksissa, kun liuksen lämpötila on oikea eli optimoitu sellaiseksi, että beetaglukaanin liukeneminen on mahdollista (Mäkelä 2017). Geeliytyminen tapahtuu beetaglukaanin osittaisen liukenemisen vuoksi, jonka mahdollistaa osittaisessa liukenemisessä syntyneet nukleaatiopaikat (kuva 7) (Mäkelä ym. 2017).



Kuva 7. Beetaglukaanin geeliytyminen ja liukeneminen (Mäkelä ym. 2017).

2.3.3 Beetaglukaanin pysyvyys

Beetaglukaania sisältävien elintarvikkeiden tai beetaglukaanilla rikastettujen elintarvikkeiden beetaglukaanimolekyylien tulisi säilyä prosessoinnin ja säilytyksen aikana mahdollisimman stabiileina, jotta toiminnalliset ominaisuudet ja terveysvaikutukset säilyisivät kuluttajille saakka. Viljan beetaglukaanin tiedetään hajoavan kuumentamisen ja

paistamisen aikana. Kuumennus (120°C) ja korkeapainehomogenointi (300-1000 bar) pilkkovat liukoista beetaglukaania ja laskevat beetaglukaaniliuosten viskositeettia merkittävästi (Kivelä 2011).

Prosessoinnin vaikutusta beetaglukaanipitoisuuteen on tutkittu. Keittäminen säilyttää parhaiten beetaglukaanipitoisuuden ja paistaminen huonoiten. Ohran beetaglukaani muodostaa kiinteämmän ja vahvemman rakenteen kuin kauran beetaglukaani (Johansson 2006).

Beetaglukaanin rakenteen hajoamiseen vaikuttavat happiradikaalit, etenkin hydroksyyli-radikaalit, sellaisissa olosuhteissa, joissa entsymaattinen ja hapon aikaansaama hydrolyysi on estetty. Hydroksyyli-radikaaleja muodostuu, kun siirtymämetalleista esim. rauta tai kupari reagoivat hydroperoksidin kanssa. Pelkistyspotentiaaliltaan omaavat yhdisteet, kuten askorbiinihappo, voivat pitää metallit aktiivisessa pelkistyneessä tilassa. Yhdisteet pystyvät myös pelkistämään liukenematonta happea ja muodostamaan siten reaktioiden kautta lopputuotteena hydroperoksidia. Tämä Fenton-reaktio on tyypillinen vesiliuoksissa ja hajottaa polymeerien rakennetta (Kivelä ym. 2008).

2.3.4 Beetaglukaanin viskositeettiin vaikuttavat tekijät

Beetaglukaanilla on hyvä vedensidontakapasiteetti ja kyky muodostaa korkean viskositeetin omaavia liuoksia sekä geeliytyä (Kivelä ym. 2009). Beetaglukaani on liukoinen veteen johtuen sen taipuisasta "random coil" (satunnaisvyyhti) -rakenteesta. Beetaglukaanin vesiliukoisuus on kauran soluseinistä yleensä parempi kuin ohran soluseinistä. Liukoisuus on tärkeimpiä tekijöitä teknologisen soveltuvuuden ja fysiologisen vaikutuksen kannalta. Mitä suurempi DP3:DP4 suhde beetaglukaaniketjussa on sitä pienempi on liukoisuus (Izydorczyk ja Dexter, 2008). Suhdeluvun on osoitettu olevan korkeampi ohrassa kuin kaurassa, mikä viittaa suurempaan sellotrioosisegmenttien määrään. Toisaalta kauran beetaglukaani on vähemmän säännöllinen muodoltaan kuin ohran ja on siksi huonommin geeliytyvä kuin ohran beetaglukaani (Johansson ym. 2004).

Beetaglukaanin reologisiin ominaisuuksiin vaikuttavat molekyyli-rakenne, -massa sekä liuoksen konsentraatio (Wood 2002). Reologisiin ominaisuuksiin vaikuttavat beetaglukaaniketjujen kyky assosioitua, johon vaikuttaa DP3:DP4 -suhde ja järjestys

(Brennan 2005). Ominaisuuksiin vaikuttaa myös polymeraatioaste ja siten myös edellä mainittu molekyyli­massa (Brennan, 2005). Tekijät, jotka vaikuttavat reologisiin ominaisuuksiin kuten viskositeetti­ominaisuuksiin, vaikuttavat ruuan rakenteeseen sekä ravitsemuksellisiin ominaisuuksiin. Brennan raportoi Toshin ym. (2004a) tutkimuksesta, jossa todettiin että DP3:DP4 -suhteen vaikuttavan beetaglukaaniketjujen geeliytymis­ominaisuuksiin sekä elastisuuteen (Brennan 2005). Lazaridou ym. (2004) raportoivat geeliytymiskyvyn lisääntyvän molekyyli­painon pienentyessä ja DP3:DP4-suhteen kasvaessa. Nämä tekijät lisäsivät myös geelin vahvuutta ja vähensivät geelirakenteen haurautta. Ohran beetaglukaanin viskositeetti on hiukan suurempi kuin kauran ja viskositeettierot johtuvat molekyyli­rakenteista. Erot viskositeettieroissa selittyvät DP3:DP4-suhteiden eroista. Woodin (2002) mukaan beetaglukaanin viskositeetti­ominaisuudet ovat osasyynä sen terveysvaikutus­ominaisuuksiin.

Beetaglukaanilla on taipumus muodostaa aggregaatteja vesiliuoksessa. Aggregaatit voivat olla rakenteeltaan löyhempiä ja pienempiä polymeerikasautumia tai tiheämpään pakkautuneita ja suurempia aggregaatteja (Grimm ym. 1995). Aggregaattien muodostumisen vaikutuksesta molekyylit pakkautuvat tiheämmin yhteen kietoutuen toistensa ympärille. Kun polymeerit kiinnittyvät toisiinsa vetysidoksin, niiden vedensidontakyky vähenee, mikä laskee liuoksen viskositeettia (Kivelä ym. 2009).

2.4 Beetaglukaanin rakennetta hajottavat tekijät

2.4.1 Olosuhteet ja säilytys

Prosessoinnin ja säilytyksen aikana on monia tekijöitä, jotka voivat aiheuttaa beetaglukaanin rakenteen hajoamista. Tunnettuja tekijöitä ovat happohydrolyysi ja entsymaattinen hydrolyysi. Hydrolyysi on otettava huomioon, kun tarkastellaan heikkojen happojen tai heikkojen emästen suolojen vesiliuoksia. Niissä hydrolyysi tarkoittaa suolan lähtöaineena olevan heikon hapon tai emäksen muodostumista vesiliuokseen.

Åman ym. (2004) osoittivat, että kiinteässä matriisissa, kuten marjoja tai hedelmiä sisältävässä kaurahiutalepuurossa, ei tapahdu merkittävää beetalukaanin rakenteen hajoamista. Johtopäätöksenä oli, että nestemäisissä olosuhteissa, kuten mehussa, rakennetta hajottaa happohydrolyysi. Matalassa pH:ssa tarvitaan kuitenkin myös korkeaa lämpötilaa,

jotta beetaglukaanin glykosidiset sidokset katkeavat. Siksi mehussa oleva beetaglukaanin hajoaminen saattaa olla askorbiinihapon aikaansaama radikaalireaktio (Åman ym. 2004).

2.4.2 Liuoksen fysikaaliset olosuhteet

Ulkoisten olosuhteiden lisäksi liuoksen fysikaaliset olosuhteet vaikuttavat beetaglukaanin rakenteen pysyvyyteen. Fysikaalisilla olosuhteilla voidaan tarkoittaa esimerkiksi beetaglukaania sisältävän liuoksen viskositeettia. Kivelä ym. (2008) ovat osoittaneet korrelaation virtauksen vähenemän ja vähentyneen beetaglukaanin hajoamisen välillä. Heidän tutkimuksensa mukaan geelimäinen rakenne viljapohjaisissa välipalajuomissa voi suojata beetaglukaania ainakin reaktiivisten happiradikaalien aiheuttamalta rakenteen hajoamiselta. Geelimäisessä rakenteessa polymeerien muodostama molekyyliverkosto sitoo vettä, lisäksi vapaita paikkoja muiden yhdisteiden sitoutumiseen ei ole, jolloin rakenne pysyy stabiilina.

2.5 Viljauutteiden analytiikkaan sopivia menetelmiä

2.5.1 Kivennäisaineet ja ICP-MS

Kivennäisaineanalytiikassa yksi yleisesti käytetty menetelmä on ICP-MS (inductively coupled mass spectrometry) eli plasmaesmissiospektrometria yhdistettynä massaspektrometriaan. ICP-MS-tekniikan etuina on nopeus, alhaiset detektorajat, laaja lineaarinen alue sekä mahdollisuus monien alkuaineiden samanaikaiseen määrittämiseen. Ennen varsinaista analyysiä näytteet esikäsitellään. Näytteiden tuhkitukseen käytetään märkä- tai kuivapolttoja. Märkäpoltto suoritetaan reagenssien ja happojen avulla mikroaaltouunissa kuumentamalla tai vaihtoehtoisesti sähköhauteella. Märkäpolton aikana orgaaninen aines hajoaa ja näin saatu jäännös liuotetaan sopivaan liuottimeen ennen kvantitointia. ICP-MS- analyysissä näytteiden alkuaineet atomisoidaan ja ionisoidaan kuumassa argon-kaasussa. Muuttuva magneettikenttä toimii energian tuojana. Ionisoiduttuaan alkuaineet kvantitoidaan massaspektrometrisesti (Mattila ym. 2001).

2.5.2 Rasvahappoanalyysi kaasukromatografialla

Kaasukromatografia soveltuu hyvin rasvahappojen määrittämiseen. Menetelmän etuja ovat nopeus, hyvä erotuskyky ja analysointiin tarvittava pieni ainemäärä. Keskeisiä työvaiheita ovat rasvan uutto, rasvahappojohdosten valmistus ja rasvahappojen erotus ja kvantitointi kaasukromatografisesti (Mattila ym. 2001).

Menetelmässä tutkittava aine jakautuu kahden faasin välille. Kaasukromatografissa on liikkumaton nestefaasi ja liikkuva kaasufaasi. Näytteen komponenttien erottuminen tapahtuu kolonnissa (ns fused silica -kapilaarikolonne). Kolonne on uunissa ja näin lämpötilaa voidaan säätää. Liikkuvan kaasufaasin virtaus kolonnin läpi voidaan säätää kaasuventtiileillä tasaiseksi. Pieni määrä metyloitua näytettä ruiskutetaan injektoriin, jossa näyte höyrystyy ja kulkeutuu kantajakaasun mukana kolonnein. Kolonnista tulevat aineet muunnetaan sähköisiksi signaaleiksi, jotka vahvistetaan piiriturille. Saatua kuvaajaa verrataan standardiin. Rasvahapot tunnistetaan retentioaikojen perusteella. Sisäisen standardin lisäyksen perusteella lasketaan näytteessä olevien rasvahappojen määrät.

2.5.3 Lipidimääritys ohutlevykromatografialla (TLC)

TLC-levykromatografia-ajolla (thin layer chromatography, TLC) tarkastellaan uutteen sisältämiä lipifraktioita ja analysoidaan vesiuutteista poolisten ja poolittomien lipidien esiintyvyyttä.

2.5.4 Proteiinipitoisuuden määrittäminen typpipitoisuuden perusteella

Ensimmäinen 1800-luvulta peräisin oleva typenmäärittäminen menetelmä, jonka sovellukset ovat edelleen käytössä, on Dumasin typen määrittämiseen vuonna 1831 julkaisema menetelmä. Dumasin menetelmässä näyte poltetaan korkeassa lämpötilassa hapessa ja typpi yhdisteistä vapautunut typpi erotetaan muista pyrolyysituotteista kaasukromatografisesti ja määrä kvantitoidaan lämmönjohtokykydetektorilla (Salo-Väänänen 1996).

Menetelmän etuna on nopeus ja helppous, menetelmässä ei muodostu hankalia polttokaasuja eikä määrittelyyn tarvitse käyttää syövyttäviä reagensseja (Mattila ym. 2001).

2.5.5 Fenolisten yhdisteiden määrittäminen UHPLC-kromatografialla

UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) nestekromatografiassa liikkuvana faasina on neste ja stationaarifaasina kiinteä faasi tai joissakin tapauksissa neste. Näytteeltä vaaditaan liukoisuutta sopivaan liuottimeen. Nestekromatografiassa näytekomponenteilla on aktiivinen vuorovaikutus sekä liikkuvan että stationaarifaasin kanssa. Nestekromatografialaitteiston toiminta on yksinkertainen. Pumppu pumppaa eluentia kolonnin läpi tietyllä virtausnopeudella. Injektoitaessa eluentti kulkee injektorin läpi. Se kuljettaa näytteen mukanaan kolonniin. Komponenttien erilaiset vuorovaikutukset stationaarifaasin ja eluentin välillä aiheuttavat erottumisen. Tämä havaitaan detektorin avulla. Nestekromatografiadetektorit eivät reagoi lämpötilan muutoksiin tai virtausmuutoksiin. Ne eivät aiheuta piikkien levenemistä tai tuhoa näytettä. Yleisin detektori nestekromatografiassa on UV/VIS-detektori. Ohjelmoinnin avulla voidaan valita kiinteä aallonpituus tai vaihtuva aallonpituus. Diodirividetektorin avulla voidaan suorittaa mittaus usealla eri aallonpituudella samanaikaisesti.

2.5.6 Beetaglukaanin määrittäminen entsymaattisesti

Beetaglukaanin määrittelyyn viljauutteista voidaan käyttää Megazymen menetelmää ”mixed linkage beta-glucan assay” (Megazyme, Wicklow, Irlanti). Menetelmässä beetaglukaanin pilkotaan kahdessa vaiheessa glukoosiksi. Ensin puskuriin uutettujen näytteiden annetaan reagoida lichenasientsyymien kanssa. Tämän jälkeen lichenasientsyymien muodostuneet beetagluko-oligosakkaridit reagoivat β -glukosidaasin kanssa, jolloin syntyy glukoosia. Näin muodostunut glukoosi analysoidaan glukoosioksidaasi/peroksidaasi-reagenssilla. Näytteiden absorbanssi mitataan spektrofotometrillä.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

Työn tavoitteena oli selvittää kauran ja ohran viljauutteiden koostumusta eri mikro- ja makrokomponenttien osalta valituin analyttisin menetelmin. Viljauutteiden sisällön analyysistä toivottiin löydettävän lisäselityksiä aikaisemmin vastaavista näyteliuoksista määritetyille radikaalinmuodostumisarvoille sekä viskositeettimuutoksille.

Aikaisemmin Mäkisen (2010) analysoimista viljauutenäytteistä todettiin, että tutkittavien näytteiden viskositeetti laski 30-95 % seurannan aikana (28 vrk). Kaikissa näytteissä myös muodostui radikaaleja 50 ° C:teen lämpötilassa yhden tunnin aikana. Kauranäytteiden radikaalinmuodostuksen todettiin olevan hieman ohranäytteitä voimakkaampaa. Lisäksi kaurauutteet olivat herkempiä lisätylle raudalle. Löydös osoitti, että radikaalivälitteiset hapettumisprosessit saattavat olla beetaglukaanin epästabiilisuuden taustalla ja että uutteen endogeenisellä vetyperoksidilla saattoi olla todennäköinen rooli hapettumisprosesseissa. (Mäkinen 2010).

Tässä tutkimuksessa haluttiin tuoda lisäselvyyttä kivennäisaineiden ja niiden reaktioihin vaikuttavien yhdisteiden merkityksestä sekä muiden makromolekyylien pitoisuuksista ja mahdollisista vaikutuksista. Määrityksistä toivottiin selittäviä syy-seuraussuhteita jo aiemmin osittain vastaavista näyteliuoksista tehdyille löydöksille, koska beetaglukaanin hajoaminen nestemäisissä matriiseissa voi heikentää elintarvikkeiden laatuominaisuuksia ja viskositeetin laskun kautta myös beetaglukaanin terveydelle edullisia vaikutuksia.

Kokeellisen osan näyteanalyysit tehtiin Helsingin yliopiston maatalous-metsätieteellisen tiedekunnan viljateknologian, elintarvikekemian, yleisen kemian ja metsäekologian laboratorioissa.

3.1 Materiaalit ja menetelmät

3.1.1 Materiaalit

Kokeellisen osion materiaalit löytyvät liitteestä 1 ja 2. Liitteisiin on koottu käytetyt laitteet sekä reagenssi- ja liuotintiedot.

3.1.1.1 Näytteet

Näyteuutteet valmistettiin neljästä kaura- ja kahdesta ohranäytteestä veteen ja fosfaattipuskuriin (pH 7). Aikaisemmin osittain vastaavista näytteistä tehdyistä uutteista jätettiin puskuriuutteen osalta pH 8 näyteuutteet pois, sillä pH 7 puskuriuutteissa viskositeetin stabiilius oli heikompaa ja radikaalinmuodostus voimakkaampaa (Mäkinen 2010). Siksi pH 7 puskuriuutteiden sisällön analyysi valittiin tähän tutkimukseen.

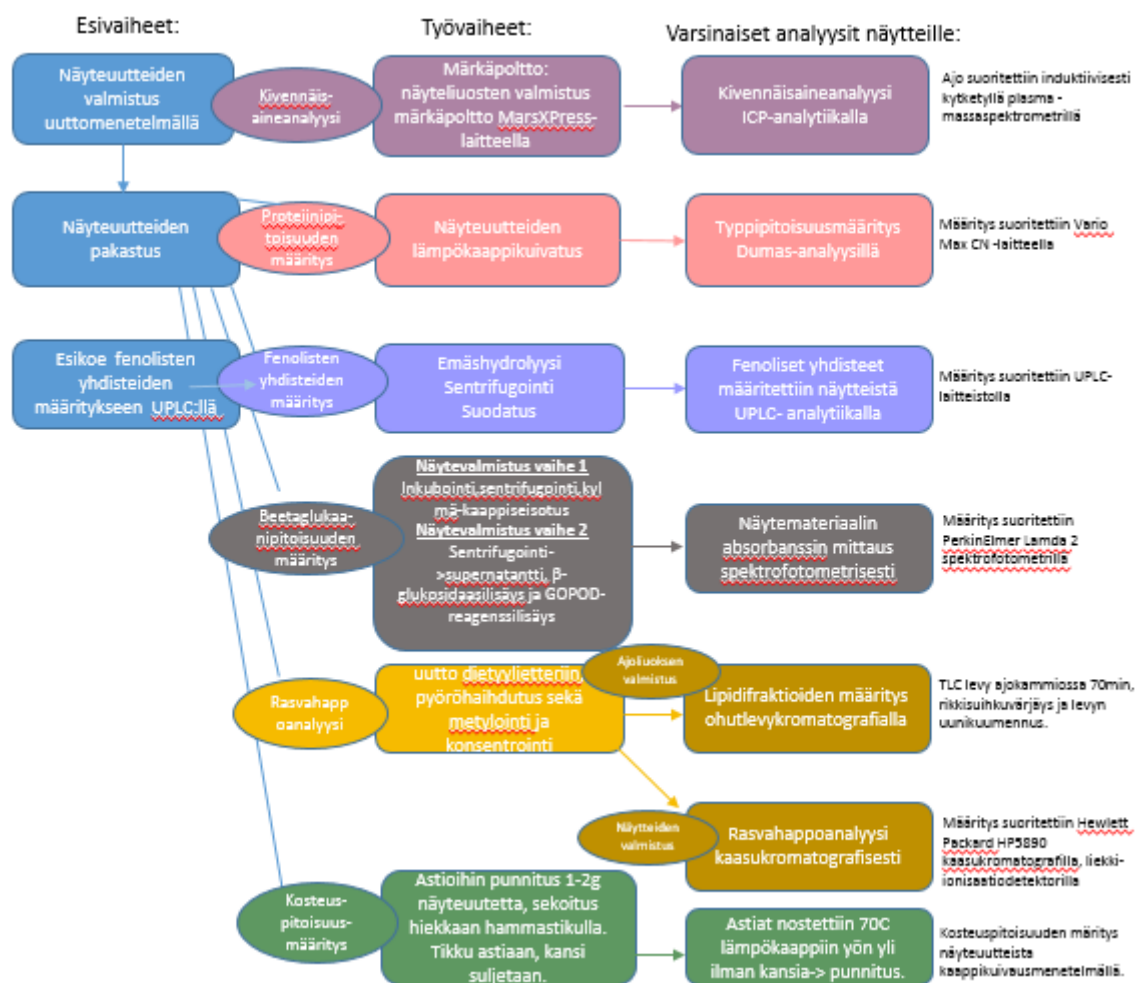
Taulukkoon 5 on koottu kaikki käytetyt näytemateriaalit, jauhojen määrä on ilmoitettu 150 ml:ssa uutetta. Tarkoituksena oli uuttaa sama määrä beetaglukaania jokaisesta näytemateriaalista, siksi painot vaihtelevat näytemäärien osalta.

Taulukko 5. Näytetiedot ja näytemäärät liuoksessa (150 ml)

Näytteet	Näytemäärä (g)	Käsittely	Merkki/Valmistaja	Raaka-aine
VTT _{CO2}	6,75	hiilidioksiduuutettu	VTT,Otaniemi	kauralese
VTT _{enstyymiakt}	6,75	lämpökäsittely	VTT,Otaniemi	kauralese
Ohran _{jauhettuNalle}	16,5	lämpökäsittely	Raisio	ohrahiutale
KLK _{SOF}	9,0	lämpö- ja etanolikäsittely, jauhettu Viikissä	Swedish Oat Fiber	kauralesekonsentraatti
KLK _{BFK}	7,5	etanolikäsittely	Bonafiber,Lahti	kauralesekonsentraatti
KLK _{OBC15%}	6,0	etanolikäsittely: OBC15%	Suomen Viljava	kauralesekonsentraatti
OLK _{BFO}	31,5	lämpökäsittely	Bonafiber,Lahti	ohralesekonsentraatti

3.1.2 Menetelmät

Kokeellisen tutkimuksen analytiikkaan kuului useita menetelmiä ja työvaiheita. Analyysimenetelmiksi valittiin keskeisimmät mikro- ja makromolekyylien analytiikkaan soveltuvat analyysit. Kuvassa 8 on kuvattu prosessikaavio näytteille tehdyistä määrittämisistä.



Kuva 8. Kokeellisen osion työvaiheet.

3.1.2.1 Näyteuutteen valmistus

Näytejauhoja punnittiin näyteputkiin ($V = 200$ ml) taulukon 5 mukainen määrä. Punnittavat määrät vaihtelivat, koska tarkoituksena oli uuttaa sama määrä beetaglukaania. Putkiin lisättiin 150 ml Milli-Q®-vettä tai puskuriliuosta (0,1 M fosfaattipuskuri, pH 7), ja lisäyksen jälkeen putkia ravisteltiin hyvin. Näytteitä inkuboitii 50 °C:ssa 30 min, jonka jälkeen

näytteet sentrifugoitiin (10 000 rpm 10 min). Supernatantti siirrettiin uusiin putkiin. Putket laitettiin kiehuvaan veteen 10 min:n ajaksi. Kiehutuksen jälkeen putket sentrifugoitiin uudelleen (10 000 rpm x 10 min). Supernatantti kerättiin talteen koeputkiin. Lopuksi lisättiin 100 µl 2-prosenttista Na-atsidiliuosta 10 ml:aan supernatanttia. Na-atsidiliuoksen lisäys tehtiin estämään mahdollinen mikrobikasvu, joka voi tuottaa liukoista kuitua pilkkovia entsyymejä. Näyteuutteita valmistettiin yhteensä 28 kpl, seitsemän vesiuutetta rinnakkaisnäytteineen sekä seitsemän puskuriuutetta rinnakkaisnäytteineen. Valmiit näyteuutteet siirrettiin pakasteeseen.

3.1.2.2 Kivennäisaineanalyysi

Kivennäisaineanalyysiin kuului kaksi työvaihetta. Ensin näytteille suoritettiin märkäpoltto, koska kvantitatiivinen määrittäminen on yleensä helpointa tehdä liuosmuodossa olevista näytteistä. Märkäpoltossa orgaanista ainesta sisältävä näyte hajotetaan voimakkailla hapettavilla liuosreagensseilla. Märkäpoltton jälkeen suoritettiin näytteiden ICP-MS- analyysi.

Märkäpoltto

Aluksi valmistettiin näyteliuokset märkäpolttoa varten. Mikroaaltoputkiin lisättiin 6 ml HNO_3 , 2 ml H_2O_2 sekä 10 ml näyteliuoksia. Valmistettiin sisäiset standardinäytteet (NIST ja Flour1) samoin. Standardeissa kuivan näytteen määrä oli 0,5 g. Putkien annettiin seistä 30 min huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne vietiin märkäpolttoon mikroaaltolaitteelle. Poltto-ohjelma sisälsi neljä eri vaihetta lämpötiloineen 70 °C \rightarrow 170 °C, kesto 2h 10 min. Märkäpoltossa ollut näyteainekerätiin suppiloon apuna käyttäen 50 ml:n mittapulloihin ja täytettiin merkkiin asti Milli-Q®-vedellä. Standardisuora varten valmistettiin standardit kaliumille, fosforille sekä muille analysoitaville kivennäisaineille ICP Multielement IV -standardia (valmistaja) käyttäen. Standardien avulla määritettiin standardisuora, jonka pitoisuudet antoivat määrittämisraajat omille näytteille.

ICP-MS-analyysi (inductively coupled plasma mass spectrometry)

Ennen ajon alkua määritettiin näytteille ja standardeille sopivat ajoparametrit. 0-näytteen sekä re-slope-arvojen määrittämistä varten ajettiin standardit. Tämän jälkeen suoritettiin näytteiden ICP-MS-analyysi ICP-laitteella.

3.1.2.3 Proteiinimääritys

Proteiinipitoisuus määritettiin Dumas analyysillä, jossa kuivattu näyteaines määritetään typen määrän suhteen. Typen kertoimella voidaan laskea proteiinin määrä näytteessä. Typen kertoimena laskennassa käytettiin lukua 6,25. Tulosten laskennassa saatiin siis määritettyä proteiinin määrä mg/ml näytteessä ja proteiinipitoisuus näyteuutteessa (%).

Näytemateriaalia pipetoitiin n. 4 ml metallikuppeihin. Tarkka punnitustulos kirjattiin ylös. Näytteet laitettiin lämpökaappiin yön yli, jossa veden annettiin haihtua yön aikana 70 °C:ssa. Aamulla näytteet vietiin Dumas-analyysilaitteelle, jonne syötettiin näytetiedot ja paino. Analyysilaitte laski näytteiden typpipitoisuuden (%), jonka perusteella proteiinipitoisuus laskettiin vesi- ja puskuriuutteissa.

3.1.2.4 Fenoliset yhdisteet ja määrittäminen nestekromatografisesti

Esikokeiden perusteella päädyttiin näyteliuosten esikäsittelyssä emäshydrolyysiin. Emäshydrolyysi suoritettiin siten, että kustakin näyteuutteesta valmistettiin kaksi rinnakkaista näytettä UHPLC :lle määritettäväksi. Esikokeiden perusteella sopivaksi näytepitoisuudeksi osoittautui 1ml näytettä. Näyteputkiin pipetoitiin 1 ml näyteuutetta ja 5 ml 1M NaOH:ia. Emäshydrolyysin annettiin vaikuttaa 1h ajan 37 °C:ssa ravistelevassa lämpöhauteessa. Emäshydrolyysi katkaistiin lisäämällä näyteputkiin väkevää (37–38 %) HCl:a 0,5 ml. Lisäyksen ajan putkia pidettiin jäähauteessa voimakkaan lämmön nousun estämiseksi. Näytteet sentrifugoitiin (5 min, 5000 rpm) ja suodatettiin ennen määrittämistä. Fenoliset yhdisteet määritettiin näytteistä UPLC-laitteella ja tulokset detektoitiin 320 nm:n aallonpituudella.

3.1.2.5 Beetaglukaanin määrittäminen entsymaattisesti

Näyteuutteiden beetaglukaanipitoisuus määritettiin entsymaattisesti Megazymen kitillä ja menetelmällä (Mixed-linkage beta-glucan assay procedure). Analyysissä näyteuutteiden annettiin reagoida lichenasientsyymien kanssa. Supernatantista otettu näyte reagoi tämän jälkeen beta-glukosidaasin kanssa. Näin muodostunut glukoosi analysoitiin glukoosi oksidaasi/peroksidaasi-reagenssilla.

Beetaglukaanin hydrolyysi suoritettiin kahdessa vaiheessa, jonka jälkeen suoritettiin mittaus spektrofotometrillä.

Beetaglukaanin hydrolysoinnin 1. vaihe. Ensin näyteuutteita punnittiin koeputkiin 1g:n tarkuudella (tarkka paino kirjattiin ylös) ja lisättiin 0,2 ml 50 %:sta (v/v) etanolia. Koeputkiin lisättiin myös 4 ml 20 mM Na-asetaatipuskuria ja sekoitettiin koeputkisekoittajalla. Koeputkia inkuboitii 60 s kiehuvaassa vesihauteessa, sekoitettiin ja inkuboitii uudelleen vielä kahden minuutin ajan. Inkuboinnin ja sekoituksen jälkeen näytteitä seisotettiin vesihauteessa (5 min, 50 °C) ja lisättiin magneetit koeputkiin. Koeputkiin lisättiin lichenasientsyymiä ja putket laitettiin 50 °C :seen vesihauteeseen magneettisekoittajaan 90 min ajaksi. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 5 ml 200 mM Na-asetaatipuskuria (pH 4) ja sekoitettiin koeputkisekoittajalla. Koeputkien annettiin seistä huoneenlämmössä 5 min ajan, jonka jälkeen koeputket sentrifugoitiin 10 min ajan (1000 rpm). Tämän jälkeen koeputket laitettiin kylmäkaappiin yön yli.

Seuraavana päivänä sentrifugoitiin putket uudelleen (4000 rpm, 10 min). Jokaisesta putkesta pipetoitiin 0,1ml supernatanttia kolmeen putkeen kahdeksi rinnakkaiseksi näytteeksi ja yhdeksi nollanäytteeksi.

Standardinäytteet. Valmistettiin glukoosistandardiputket (2 kpl), joissa oli 50 µl 50 mM Na-asetaatia (pH4) ja 50 µl glukoosistandardia sekä 2 kpl putkia, joissa oli 100 µl glukoosistandardia.

Kaikki koeputket laitettiin hetkeksi 50 °C:steen vesihauteeseen. 0-putkiin lisättiin 0,1 ml 50 mM Na-asetaatipuskuria (pH4).

Beetaglukaanin hydrolysoinnin 2. vaihe ja absorbanssin mittaus. Näyteputkiin lisättiin 0,1 ml β-glukosidaasia ja sekoitettiin koeputkisekoittajalla. Lisäykset tehtiin 10 s välein. β-glukosidaasin annettiin reagoida 10 min ajan. Tämän jälkeen lisättiin kaikkiin putkiin GOPOD-reagenssia 10 s välein ja annettiin reagoida 50 °C:ssa vesihauteessa 20 min. Inkuboinnin jälkeen poistettiin putket vesihauteesta ja kaadettiin näytemateriaali kyvetteihin ja mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä aallonpituudella 510 nm tunnin kuluessa.

3.1.2.6 Rasvahappoanalyysi ja lipidien määrittäminen

Rasvahappoanalyysi tehtiin vain vesiuutetuille näytteille. Rasvahappoanalyysiin kuului useampi työvaihe. Lipidikoostumus määritettiin ohutlevykromatografialla (TLC). Rasvahappojen kvantitatiivinen määrittäminen tehtiin kaasukromatografisesti.

Vesiuutetuille suoritettiin ensin varsinaista kaasukromatografia-ajoa koeluonteinen rasvahappoanalyysi (alla kuvattuine työvaiheineen), jotta nähtiin, toimiiko valittu menetelmä vilja-vesiuutetuille.

Näytteiden esikäsittelyvaiheisiin kuului uutto dietyylietteriin, haihdutus sekä metylointi. TLC-ajoa varten näytteille tehtiin uuton ja pyöröhaihdutuksen jälkeen konsentrointi ennen pipetointia TLC-levyille ja ajoliuokseen laittoa.

Näytteiden esikäsittely

Näytteiden esikäsittely sisälsi kolme eri työvaihetta; uuton dietyylietteriin, pyöröhaihdutuksen ja metyloinnin. Aluksi näyteutetuista siirrettiin 20ml:a 50ml:n mittapulloihin. Mittapulloihin lisättiin 5ml 8-molaarista HCL:a ja tarkistettiin pH, joka oli alle 3.

Uuttoa varten näytteet siirrettiin (rinnakkaisista näytteistä tehtiin vielä rinnakkaiset) 100ml:n erotussuppiloihin. Erotussuppiloihin lisättiin hiukan NaCl:a ja 25ml dietyylietteriä. Näytteitä ravisteltiin ja suppiloihin lisättiin pieni määrä etanolia faasien erottumisen jouduttamiseksi. Erottunut alakerros valutettiin jäteastiaan ja säilytetylle yläkerrokselle toistettiin uutto uudelleen lisäämällä 25 ml dietyylietteriä. Erottunut alempi kerros valutettiin jäteastiaan. Näytteeseen lisättiin 10 ml Milli-Q®- vettä ja hiukan kylläistä NaCl-liuosta ja annettiin faasien erottua. Sen jälkeen valutettiin jälleen alin kerros jäteastiaan. Pesu toistettiin uudelleen. Jäljelle jäänyt eetterikerros kaadettiin kolviin, johon sisäinen standardi (19:0) oli lisätty (1ml). Tämän jälkeen näytteet pyöröhaihdutettiin. Haihdutetut näytteet liuotettiin diklorometaaniin. Liuotettu näyte (n. 2 ml) siirrettiin uuteen kolviin, kolvi huuhdottiin ja liuos kaadettiin 5 ml:n mittapulloon. Näytteet metyloitiin täyttämällä mittapullot merkkiin diklorometaanilla.

Lipidien määrittäminen ohutlevykromatografialla (TLC)

TLC-levykromatografia-ajolla oli tarkoitus tarkastella uutteen sisältämiä lipidifraktioita ja analysoida vesiutteen poolisten ja poolittomien lipidien esiintyvyyttä. Kvalitatiivinen määrittäminen oli tässä tapauksessa riittävä yhdessä tarkemman rasvahappoanalyysin kanssa näyteuutteen lipidiprofiilin määrittämiseen.

5ml:n mittapullossa olevista näytteistä pipetoitiin 1ml 10ml:n näyteputkiin ja haihdutettiin näyte kuiviin typpivirralla. Lisättiin 100 µl liuottimena toimivaa diklorometaania näyteputkiin ja pipetoitiin koko määrä TLC-levylle. Ajoliuoksena käytettiin heptaanidietyylieetteri-jäätikkaseosta suhteella 80 ml + 20 ml + 2 ml. Liuos kaadettiin ajokammioon ja annettiin ajoliuoksen tasapainottua. Kun TLC-levy oli ollut ajokammiossa 70 min, värjättiin se rikkisuihkulla ja vietiin 120 °C:n uuniin 2 min ajaksi ja havainnoitiin tulos levytä.

Rasvahappoanalyysi kaasukromatografisesti

Ennen ajoa näytteet esikäsiteltiin eli metyloitiin, koska rasvahappojen oli oltava haihtuvassa muodossa. Tästä syystä rasvahapoista valmistettiin metyyliesterijohdokset, jotka olivat haihtuvia kaasukromatografian lämpötilassa. Aluksi 5 ml:n mittapullossa oleva näyte jaettiin kahteen pieneen kierrekorkilliseen koeputkeen, 2 ml näytettä kumpaankin. Lisättiin koeputkiin 2 ml 0,5 M NaOH-metanoliliuosta. Tämän jälkeen suljettiin korkit ja kuumennettiin näytteitä kiehuvaan vesihauteeseen 5 min ajan. Kiehutuksen jälkeen putket jäähdytettiin huoneenlämpötilaan. Putkiin lisättiin 3 ml BF₃-metanolireagenssia, jonka jälkeen keitettiin näytteitä vesihauteeseen 5 min ajan. Jäähdytykseen seokseen lisättiin 3 ml heptaania ja 2 ml kylläistä natriumkloridiliuosta. Koeputket ravisteltiin ja annettiin kerrosten erottua. Ylempi erottunut faasi (heptaani) siirrettiin pasteur-pipetillä toiseen koeputkeen, jonka pohjalle lisättiin ensin ripaus kuivausaineena toimivaa Na₂SO₄:a.

Uutteita säilytettiin jääkaapissa kaasukromatografiseen määrittämiseen asti. Kaasukromatografisen määrittämisen ajo-olosuhteet kirjattu liitteeseen 2.

3.1.2.7 Kosteuspitoisuuden määrittäminen kaappikuivausmenetelmällä

Näytteistä määritettiin kosteuspitoisuudet AACC 44-60-menetelmällä eli kaappikuivausmenetelmällä (AACC, 2000). Koska viljanäytteet olivat näyteuutteita, näytteiden kosteuspitoisuus otettiin huomioon laskennassa kaappikuivausmenetelmän tulosten perusteella (pienentää todellista näytemäärää). Kosteusmäärittämissä astioihin punnittiin 5g kvartsihiekkaa. Astioihin lisättiin pieni lasisauva tai hammastikku. Astiat laitettiin lämpökaappiin, ilman kansia tunnin ajaksi. Näytteet otettiin pois uunista, peitettiin kansilla ja nostettiin eksikaattoreihin jäähtymään. Kupit jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi (jäähtymisaika 1h 40min.). Tämän jälkeen astiat punnittiin analyysivaa'alla.

Astioihin punnittiin 1-2g näyteuutetta ja sekoitettiin hiekkaan tikulla/lasisauvalla. Tikku jätettiin astiaan ja kansi suljettiin. Astiat nostettiin 70 °C:n lämpökaappiin yön yli ilman kansia. Näyteastiat punnittiin seuraavana aamuna analyysivaa'alla ja näytteiden painohävikkien perusteella laskettiin näytteiden kosteuspitoisuus ja kuiva-ainepitoisuus.

3.2 Tulokset

Tässä tutkimuksessa määritettiin ohra- ja kaurauutteiden, sekä vesi- että puskuruuhteiden, makrokomponenttien eli beeta-glukaanin, proteiinien ja rasvahappojen sekä fenolisten yhdisteiden ja kivennäisaineiden määrää erilaisten analyttisten menetelmien avulla. Uutteet pakastettiin heti valmistuksen jälkeen ja sulatettiin kutakin analyysiä varten. Analyysit suoritettiin kolmen kuukauden sisällä uutteiden valmistuksesta.

3.2.1 Näyteuutteiden beeta-glukaanipitoisuudet

Koska näyteuutteet valmistettiin kaupallisista valmisteista (pl Ohrah.jauhettuNalle) oli takoituksena tässä tutkimuksessa analysoida näytteiden sisältöjä ja tuottaa samalla tietoa näyteuutteiden sisällöstä. Vastaavista näytemateriaaleista tehtiin tutkimusta myös muissa tutkimuksissa. Punnittavat näytemäärät saatiin tähän tutkimukseen valmiiksi määritettyinä, jolloin oli jo arvioitu, millä näytemäärillä mm. beeta-glukaanin saataisiin uutettua sama määrä.

Vesiuutteiden beetaglukaanipitoisuus oli suurin VTT:n hiilidioksiduutetussa kauralese- (VTT_{CO2}) sekä ohralesekonstraattiuutteissa (OLK_{BFO}), n. 0,4 %. Muiden vesiuutteiden beetaglukaanipitoisuus oli 0,10-0,16 %.

Puskuriuutteiden beetaglukaanipitoisuus (w/w) oli vesiuutteita hieman pienempi kaikissa uutteissa pitoisuuden jäädessä välille 0,10 % ja 0,36 % paitsi jauhetussa ohrahiutalenäytteessä, jossa pitoisuus oli sama 0,13%, sekä vesi- että puskuriuutteessa. Suurimmat pitoisuudet beetaglukaanina oli hiilidioksiduutetussa kauraleseuutteessa VTT_{k CO2} ja lämpökäsitellyssä ohralesekonstraattiuutteessa OLK_{BFO}. Pitoisuudet olivat näissä näytteissä suurimmat (n. 0,4%) sekä puskuriuutteissa että vesiuutteissa ja poikkesivat muiden uutteiden pitoisuuksista, jotka jäivät välille 0,1 % ja 0,2 % (taulukko 7).

Taulukko 6. Tutkittujen uutteiden beetaglukaanipitoisuus

Uute	Beetaglukaanipitoisuus (% w/w)	Beetaglukaanipitoisuus (% w/w)
	<i>vesiuutteet</i>	<i>puskuriuutteet</i>
VTT _{CO2}	0,38 ± 0,03	0,36 ± 0,02
VTT _{enstymik}	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Ohrah. jauhetuNalle	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,01
KLK _{Etanoli}	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,03
KLK _{BFK}	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01
KLK _{OBC15%}	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,01
OLK _{BFO}	0,39 ± 0,05	0,35 ± 0,06

3.2.2 Näyteuutteiden proteiinipitoisuus

Proteiinipitoisuus oli samaa suuruusluokkaa sekä vesi- että puskuriuutteissa.

Suurin proteiini määrä oli hiilidioksiduutetussa kauraleseuutteessa (VTT_{CO2}) ja ohralesekonstraattiuutteessa (OLK_{BFO}). Suurin ero pitoisuuksissa oli vesi- ja puskuriuutteiden välillä ohralesekonstraattiuutteissa (OLK_{BFO}). Vesiuutteessa pitoisuus oli 3,97 mg/g, kun taas puskuriuutteessa määrä oli 5,04 mg/g (taulukko 8). Tulosten perusteella voidaan todeta, että uuton yhteydessä näytteille tehty lämpökäsittely ei ole denaturoinut kaikkia proteiineja näytteistä.

Taulukko 8. Tutkittujen uutteen proteiinipitoisuus.

Uute	proteiinipitoisuus mg/g	proteiinipitoisuus mg/g
	<i>vesiuutteet</i>	<i>puskuriuutteet</i>
VTT _{CO2}	4,08	4,07
VTT _{enstymik}	1,98	1,75
Ohrak. jauhetu _{Nalle}	1,52	1,00
KLK _{Etanoli}	1,93	1,50
KLK _{BFK}	2,03	2,07
KLK _{OBC15%}	1,27	1,38
OLK _{BFO}	3,97	5,04

3.2.3 Näyteuutteen fenolisten yhdisteiden pitoisuus

Fenolipitoisuudet kvantitoitiin ferulahappona (taulukko 10). Suurin fenolipitoisuus oli ohralesekonstraattiuutteissa (OLK_{BFO}). Sekä vesi- että puskuriuutteessa pitoisuus oli n. 15 µg/ml (Taulukko 9). Muiden vesiuutteen pitoisuus jäi välille 2–10 µg/ml. Selkeää eroa suuruusluokassa vesi- ja puskuriuutteen välillä ei voitu tehdä. Osassa näytteitä fenolisia yhdisteitä oli enemmän vesiuutteissa, kun taas osassa niitä oli enemmän puskuriuutteissa.

Taulukko 9. Tutkittujen uutteen fenolipitoisuus.

Uute	fenolisten yhdisteiden pitoisuus $\mu\text{g/ml}$	fenolisten yhdisteiden pitoisuus $\mu\text{g/ml}$
	<i>vesiuutteet</i>	<i>puskuriuutteet</i>
VTT _{CO2}	2,43 \pm 0,37	4,51 \pm 0,75
VTT _{ensyymik}	3,12 \pm 0,14	7,17 \pm 0,15
Ohran. jauhetu _{Nalle}	2,12 \pm 0,90	2,91 \pm 0,19
KLK _{Etanoli}	3,90 \pm 0,26	2,75 \pm 0,60
KLK _{BFK}	9,64 \pm 0,71	7,91 \pm 0,99
KLK _{OBC15%}	5,81 \pm 0,38	4,00 \pm 0,12
OLK _{BFO}	15,53 \pm 2,40	14,53 \pm 1,00

Fenoliset yhdisteet määritettiin UPLC:lla. Kaikista näyteuutteista voitiin määrittää ferulahapon lisäksi kahvihappo. Osasta näyteliuoksia löydettiin myös sinappihappoa ja p-kumariinihappoa. Tarkemmat pitoisuudet kyseisistä fenolisista yhdisteistä koottu taulukoon 10.

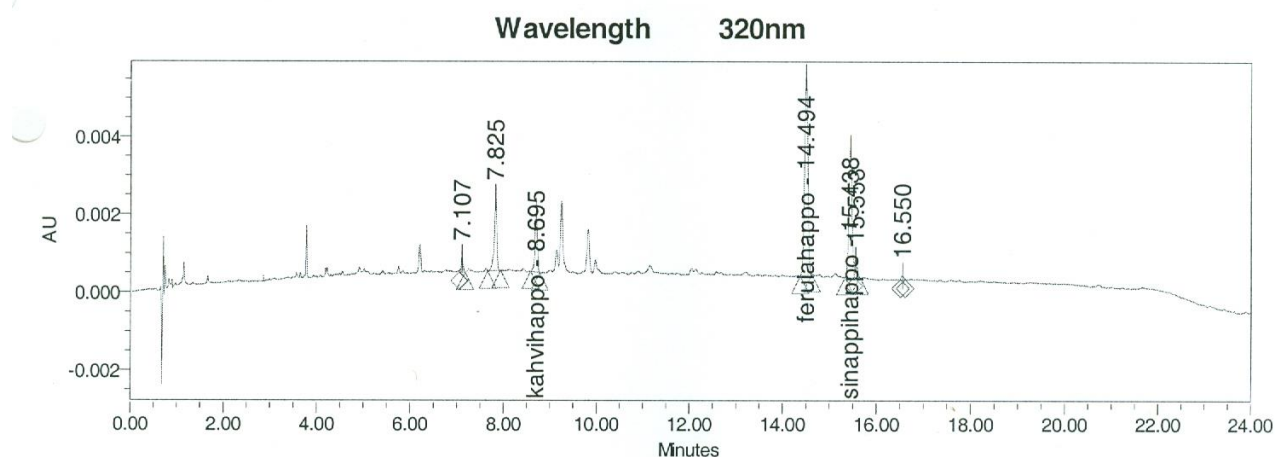
Taulukko 10. Vesiututteiden fenolipitoisuuksia. Pitoisuudet ($\mu\text{g/ml}$) .

Uute	Kahvihappo	ferulahappo	sinappihappo	p-kumarihappo
VTT _{CO2}	1,1	0,2		
VTT _{enstyymik}	1,7	1,4		0,01
Ohran. jauhetu _{Nalle}	0,7	0,4		
KLK _{Etanoli}	1,7	2,1		0,1
KLK _{BFK}	3,3	4,5	1,6	0,2
KLK _{OBC15%}	2,5	3,2		0,2
OLK _{BFO}	1,4	14,1	0,4	0,2

Taulukko 11. Puskuriututteiden fenolipitoisuuksia. Pitoisuudet ($\mu\text{g/ml}$) .

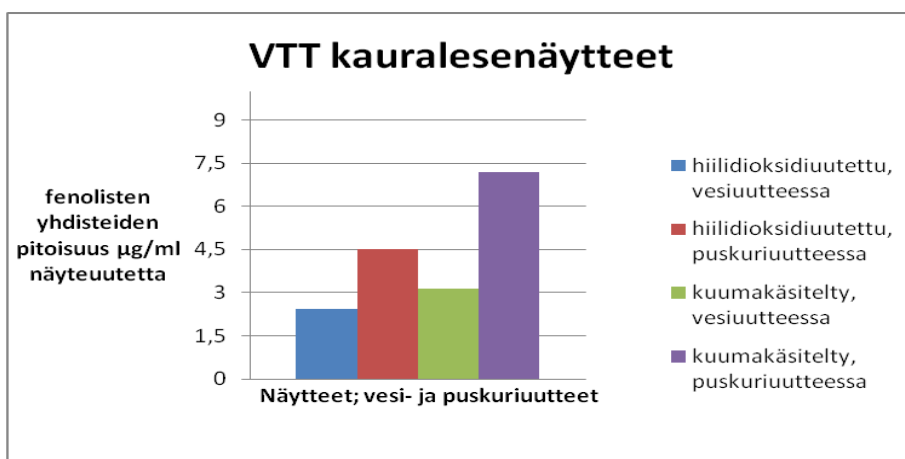
Uute	kahvihappo	ferulahappo	sinappihappo	pkumarihappo
VTT _{CO2}	1,1	3,4		
VTT _{enstyymik}	3,0	4,0		0,1
Ohran. jauhetu _{Nalle}	0,5	2,4		
KLK _{Etanoli}	1,1	1,6		
KLK _{BFK}	3,0	3,9	0,9	0,1
KLK _{OBC15%}	2,0	2,0		
OLK _{BFO}	1,0	13,6	0,3	0,2

Kuvassa 9 on esimerkki analysoiduista fenolisista yhdisteistä näytteen VTT kauralese vesiuutteesta (VTT_{CO2}). Fenoliset yhdisteet näkyvät piikkeinä 220–240 sekä 305–325 nm:n välisillä alueilla.

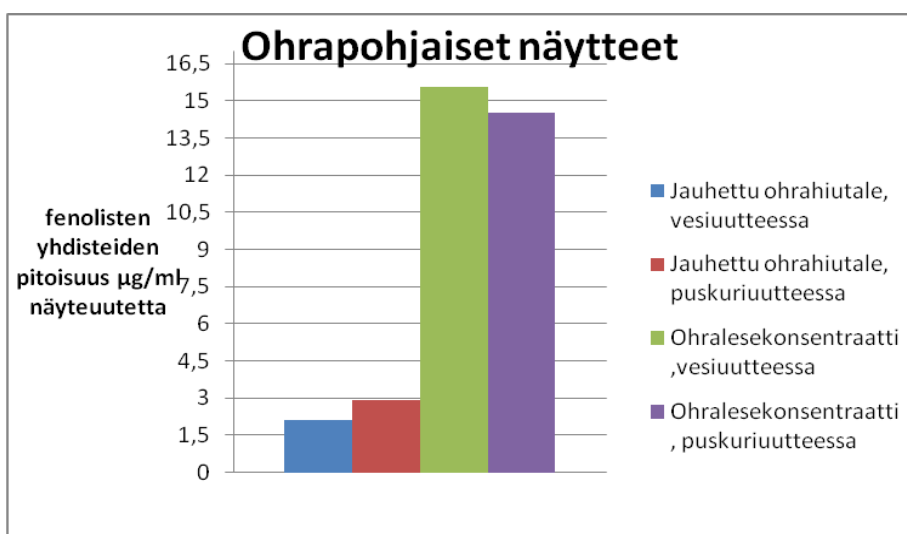


Kuva 9. UPLC:lla analysoidut fenoliset yhdisteet näyteuutteesta (VTT_{CO2}).

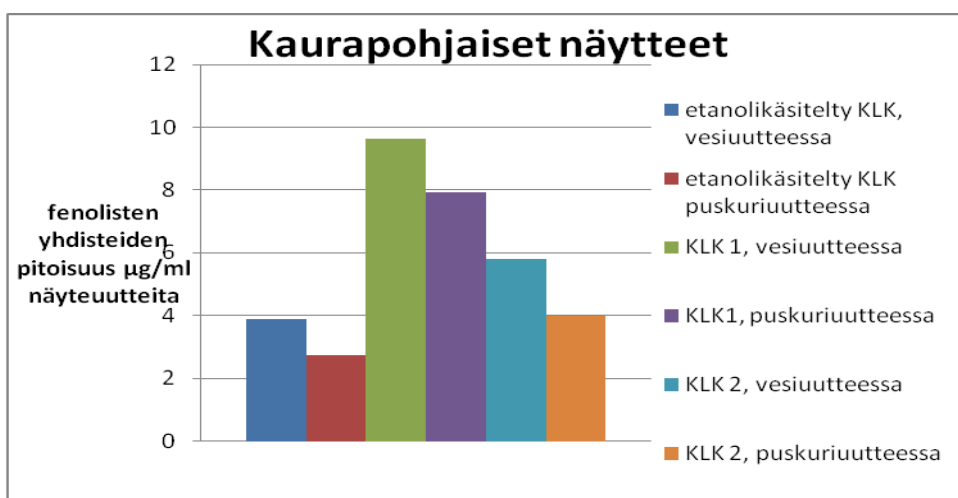
Alla olevissa kuvissa on koontina näyteuutteiden fenolisten yhdisteiden pitoisuus ilmoitettuna µg/ml näyteuutetta. Kauralesepohjaiset, ohrapohjaiset ja loput kaurapohjaiset näyteuutteet on esitetty omissa kuvaajissaan (kuvat 10, 11 ja 12). Kuvassa 10 on esitetty näytteiden VTT_{CO2} ja VTT_{enstyymiakt} vesi- ja puskuriuutteiden tulokset. Kuvassa 11 on fenolisten yhdisteiden pitoisuus vesi- ja puskuriuutteissa näytteistä Ohrah. jauhettuNalle ja Ohralesekonsentraatti, OLK_{BFO}. Kuvassa 12 on fenolisten yhdisteiden pitoisuus vesi- ja puskuriuutteissa näyteuutteista KLK_{SOF}, KLK_{BFK} ja KLK_{OBC15%}.



Kuva 10. VTT:n kauralesenäytteiden fenolisten yhdisteiden pitoisuus (µg/ml) näyteuutetta.



Kuva 11. Ohrapohjaisten näytteiden Ohrah. jauhettu_{Nalle} ja OLK_{BFO} fenolisten yhdisteiden pitoisuus (µg/ml) näyteuutetta.



Kuva 12. Kaurapohjaisten näytteiden (KLK_{SOF}, KLK_{BFK} ja KLK_{OBC15%}) fenolisten yhdisteiden pitoisuus (µg/ml) näyteuutetta.

3.2.4 Näyteutteen mineraalipitoisuus

Kivennäisaineanalyysistä haluttiin erityisesti selvittää raudan pitoisuus näyteutteen. Taulukossa 12 on koottuna kivennäisaineista rautapitoisuuksia. VTT_{CO2}-näytteessä oli moninkertainen määrä rautaa verrattuna muihin näyteutteen, etenkin vesiuutteen määrää korostui.

Taulukko 12. Tutkittujen uutteen rautapitoisuudet

Uute	Fe-pitoisuus (µg/g)	Fe-pitoisuus (µg/g)
	<i>vesiuutteen</i>	<i>puskuriuutteen</i>
VTT _{CO2}	15,0 ± 3,17	8,4 ± 1,08
VTT _{enstymik}	3,1 ± 1,87	3,0 ± 1,33
Ohrh _{jauhetu Nalle}	5,01 ± 0,0	*)
KLK _{Etanoli}	*)	1,26 ± 1,08
KLK _{BFK}	6,44 ± 2,9	2,28 ± 1,97
KLK _{OBC15%}	4,7 ± 1,08	3,78 ± 2,67
OLK _{BFO}	0,73 ± 0,73	0,9 ± 0,13

*) Määrittämisrajan ulkopuolella

3.2.5 Näyteutteen rasvahappomäärät

Lipidianalytiikka tehtiin vain vesiuutteen. Taulukossa 11 on esitetty kaikista vesiuutteen analysoitujen rasvahappomäärät.

Suurin rasvahappopitoisuus oli hiilidioksiduuutetussa kauraleseuuteessa (VTT_{CO2}). Selvästi vähiten rasvahappoja määritettiin jauhetun ohrahiutaleen uutteesta (Ohrah. jauhetu_{Nalle}).

Taulukko 11. Tutkittujen uutteen rasvahappomäärät mg/150ml vesiutetta.

Vesiuute	rasvahappomäärät mg
VTT _{CO2}	0,75 ± 0,54
VTT _{enstyymik}	0,36 ± 0,19
Ohrah. jauhetu _{Nalle}	0,10 ± 0,10
KLK _{Etanoli}	0,15 ± 0,12
KLK _{BFK}	0,52 ± 0,15
KLK _{OBC15%}	0,49 ± 0,15
OLK _{BFO}	0,49 ± 0,00

3.2.6 Näyteuutteen lipidifraktiot

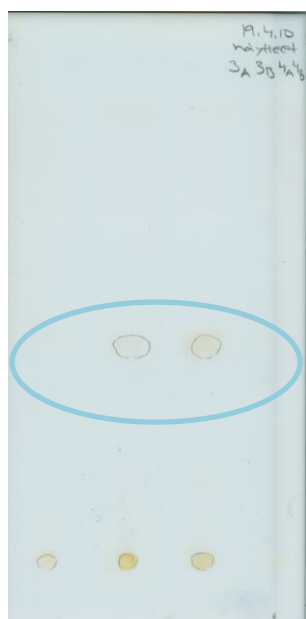
Lipidifraktiot määritettiin ohutlevykromatografialla (TLC). Ajoliuoksena käytettiin poolitonta heptaani- dietyylieetteri-jäätikka- seosta. Polaariset lipidit kiinnittyivät levyn alaosaan ja poolittomat lipidit etenivät ajoliuoksen mukana ylemmäs levyllä, kunnes kiinnittyivät. Ajo lopetettiin, kun ajoliuoksen rintama oli n. 2cm:n päässä levyn yläreunasta.

Kauraleseuutteessa (VTT_{CO2}) ei ollut poolittomia lipidejä lainkaan, vain poolisia (CO₂ - uutto poistaa neutraalit lipidit). Lipidit kiinnittyivät levyn alaosaan eivätkä edenneet ajon aikana levyllä (kuva 13).



Kuva 13. VTT_{CO2} uute sisältää vain poolisia lipidejä.

Lämpökäsitellyssä kauranäytteessä VTT_{enstyymik} oli levyn keskivaiheelle edennyt lipidifraktio, joka vastaa triasyyliglyseridejä (kuva 14).



Kuva 14. VTT_{enstyymik} uutuksessa on nähtävissä levyn keskivaiheille edennyt lipidifraktio.

Nalle- ohrahiutaleuutteessa Ohrah.jauhettu Nalle ei ollut poolittomia lipidejä lainkaan. Lipidit kiinnittyivät levyn alaosaan eivätkä edenneet ajon aikana levyllä (kuva 15).



Kuva 15. Ohrah.jauhettu Nalle uute sisältää vain poolisia lipidejä.

Etanolikäsitellyssä kauralesekonsentraattiuutteessa $KLK_{Etanoli}$ oli levyn yläosaan edennyt rintama, joka edusti näyteuutteen poolittomia lipidejä (kuva 16).



Kuva 16. $KLK_{Etanoli}$ näyteuutteessa poolittomia lipidejä.

Kauralesekonsentraattiuutteessa (KLK_{BFK}) oli levyn keskivaiheelle edennyt lipidifraktio, joka vastaa triasyyliglyseridejä (kuva 17).



Kuva 17. KLK_{BFK} näyteuutteessa levyn keskivaiheelle edennyt lipidifraktio.

Kauralesekonsentraatissa $KLK_{OBC15\%}$ ei ole nähtävissä lipidejä lainkaan (kuva 18), kuten ei myöskään ohralesekonsentraatissa OLK_{BFO} , tästä levystä ei ole kuvaa.



Kuva 18. $KLK_{OBC15\%}$ näyteuutteessa ei ole nähtävissä lipidejä lainkaan

3.3 Pohdinta

3.3.1 Utteiden beetaglukaanipitoisuus

Utteiden beetaglukaanipitoisuudet korreloivat vastaavista näytemateriaaleista aiemmin uutettuihin ja saatuihin tuloksiin joissa viljauutteiden beetaglukaanipitoisuudet olivat 0,05–0,58 % (Mäkelä 2010). Tässä tutkielmassa pitoisuudet olivat 0,08–0,39 %. Hajonta mittaustulosten välillä oli myös pientä. Aikaisemmissa mittauksissa, jotka Mäkelä (2010) teki omista näyteutteistaan, oli vesiuutteiden beetaglukaanipitoisuus pääsääntöisesti suurempi kuin puskuriutteiden kuten tässäkin tutkimuksessa. Samoin suurimmat beetaglukaanipitoisuudet määritettiin molemmissa tutkimuksissa näyteutteesta VTT_{CO2} sekä OLK_{BFO}.

Yleisesti ohran beetaglukaanipitoisuus on suurempi kuin kauralla, toisaalta kaurassa yleisesti beetaglukaanin uuttuvuus on parempi kuin ohrassa (Izydorczyk ja Dexter 2008). Tämä saattaa selittää, miksi isoimmat beetaglukaanipitoisuudet olivat sekä hiilidioksidiuutetussa kauralesenäytteessä VTT_{CO2} (uuttuvuus parempi) että toisaalta lämpökäsitellyssä ohralesekonsentraattiutteessa OLK_{BFO}, jonka beetaglukaanipitoisuus voi luonnostaan olla mahdollisesti suurempi kuin kauranäytteissä. Ohrahiutaleen Ohrah._{jauhettu Nalle} beetaglukaanipitoisuus ei taas poikennut muiden kauraleseuutteiden pitoisuuksista, vaan oli samaa luokkaa (pl. hiilidioksidiuutettu näyte VTT_{CO2}). Muut tekijät, kuten edellä mainittu uuttuvuus, voivat selittää eroja näyteutteiden pitoisuuksien välillä.

Tässä työssä ei analysoitu näytteiden fytaattipitoisuuksia, mutta myös fytaatilla on rooli beetaglukaanin rakenteen pysyvyydessä. Fytaatti suojaa beetaglukaania oksidatiiviselta hapettumiselta. (Wang 2020). Kaura sisältää fytaattia enemmän kuin ohra, jolloin kaurasta löytyvät isommat beetaglukaanipitoisuudet näyteutteissa voivat johtua myös fytaatin vaikutuksesta.

3.3.2 Utteiden proteiinipitoisuus

Utteiden proteiinipitoisuus oli välillä 1,3–5,04 mg/g. Pienin proteiinipitoisuus oli etanolikäsitellyssä kauralesekonsentraatissa (KLK_{OBC15%}) ja suurin

ohralesekoncentraattiuutteen OLK_{BFO} puskuriuutteessa. Kaurapohjaisissa näyteuutteissa suurin pitoisuus oli hiilidioksiduutetussa kauraleseuutteessa (VTT_{CO_2}), sekä vesi- että puskuriuutteissa. VTT_{CO_2} -uutteiden proteiinipitoisuus oli puolet suurempi kuin muissa kaurapohjaisissa näyteuutteissa, uuttuneiden proteiinien määrä oli suurempi.. VTT_{CO_2} -jauhon valmistusprosessissa korkein saavutettu lämpötila oli 40 °C. Alempi lämpötila ei ole vielä denaturoinut proteiineja näytemateriaalista niin tehokkaasti kuin muiden näytteiden lämpökäsittelyissä käytetyt korkeammat lämpötilat. Kaikkien näyteuutteiden valmistuksessa tehty kuumakäsittely, kiehutus 10 min ajan, on denaturoinut proteiineja kaikista näytteistä. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin todeta, että uuton yhteydessä näytteille tehty lämpökäsittely ei ole denaturoinut kaikkia proteiineja näytteistä.

Vastaavista näytemateriaaleista vastaavalla uuttomenetelmällä valmistetuista näytteistä aikaisemmin tehdyt proteiinimääritykset (Bradford-testillä) antoivat myös tulokseksi sen, että kaikissa näyteuutteissa esiintyi proteiineja (Mäkinen 2010). Vesi- ja puskuriuutteiden proteiinipitoisuuksien välillä ei ollut merkittävää eroa.

3.3.3 Uutteiden fenoliset yhdisteet

Selvästi eniten fenolisia yhdisteitä oli ohralesekoncentraatissa (OLK_{BFO}), n. 15 µg/ml näyteuutetta. Muissa uutteissa pitoisuus oli 2-10µg/ml. Selvää eroa puskuriuutteiden ja vesiuutteiden kokonaisfenolipitoisuuksien välillä ei voida tehdä. Vesiuutteissa fenolisten yhdisteiden pitoisuus oli pienimmän ja suurimman pitoisuuden välillä sellainen, että vähiten fenolisia yhdisteitä oli Nalle-ohrahiutaleuutteessa (Ohrh. jauhetu_{Nalle}) (2,1 µg/ml) ja eniten ohralesekoncentraatista (OLK_{BFO}) (15,5 µg/ml). Jälkimmäisessä oli siis 86%:a enemmän fenolisia yhdisteitä kuin vähiten yhdisteitä omaavassa uutteessa. Puskuriuutteissa ero pienemmän ja suuremman pitoisuuden välillä oli samaa luokkaa eli 85%:a.

Eniten ferulahappoa löytyi ohralesekoncentraatista (OLK_{BFO}). Sekä vesi- että puskuriuutteiden pitoisuus oli samaa luokkaa 13,6 ja 14,6 µg/ml. Toiseksi eniten fenolisista yhdisteistä mitattiin kahvihappoa, jota oli eniten kauralesekoncentraatin KLK_{BFO} vesiuutteessa ja kauraleseuutteen $VTT_{enstyymik}$ puskuriuutteessa, molemmissa n. 3 µg/ml.

Fenoliset yhdisteet voivat kelatoida eli sitoa metalleja. Siirtymämetallien sitomiskykyyn vaikuttaa fenolisen yhdisteen rakenne, hydroksyyliyhymien määrä, suunta ja läheisyys.

Metallien sitomiskyvyllä fenoliset yhdisteet voivat estää raudan ja kuparin katalysoimaa radikaalinmuodostusta (Ragae ym. 2006). Luovuttamalla vedyn radikaaleille fenolit puolestaan sammuttavat radikaaleja katkaisten siten radikaalireaktioita ja estäen rasvojen autoksidaatiota (Rice-Evans ym. 1996). Toisaalta ferulahappo toimii myös hapettumista edistävänä tekijänä. Kuten aiemmin jo teoriaosiossa tässä työssä todettiin ferulahappo, jolla on myös melko korkea pelkistyspotentiaali, voi toimia myös siis hapettumista edistävänä tekijänä tietyissä nestemäisissä olosuhteissa (Kivelä ym. 2009 a) ja näin ollen edistää beetaglukaanin rakenteen hajoamista ja vaikuttaa myös uutteiden viskositeetin menetyksiin. Mäkisen (2020) maisterintutkielman tulosten perusteella radikaalinmuodostus vastaavista materiaaleista valmistetuissa viljauutteissa oli voimakkainta hiilidioksidiuutetun kauraleseen (VTT_{CO_2}) ja kauralesekonsentraatin (KLK_{BKF}) puskuriuutteissa. Vastaavasti ohranäytteiden radikaalinmuodostus oli vähäisempää kuin kaurauutteiden (Mäkinen 2010). Fenolisia yhdisteitä oli vähiten ja eniten ohrapohjaisissa uutteissa. Tämä ei korreloi Mäkisen radikaalinmuodostustulosten kanssa, jolloin vähiten fenolisia yhdisteitä olisi luullut olevan eniten radikaaleja muodostavassa näyteuutteessa eli tutkielman kaurauutteiden puskuriuutteissa. Kauran puskuriuutteista eniten fenolisia yhdisteitä oli kuitenkin kauralesekonsentraattiuutteessa, jossa myös muodostui eniten radikaaleja (KLK_{BKF}). Ferulahapon pitoisuus näissä puskuriuutenäytteissä oli $3,9 \mu\text{g/ml}$.

3.3.4 Kivennäisaineet näyteuutteissa

Mäkinen (2010) tutki myös rauta(II) -ionien lisäämisen vaikutusta radikaalinmuodostukseen. Rautaionien lisäys aiheutti välittömän radikaalinmuodostuksen tutkituissa uutteissa. Näin ollen eniten radikaaleja muodostavassa näytemateriaalissa luulisi olevan myös eniten luontaisia metalleja, kuten rautaa. Kivennäisaineanalyysin tulokset raudan osalta eivät korreloineet Mäkisen (2010) radikaalinmuodostustulosten kanssa. Eniten rautaa oli kauralesekonsentraatin (KLK_{BKF}) vesiuutteessa ja hiilidioksidiuutetun kauraleseen vesi- ja puskuriuutteissa (VTT_{CO_2}). Myös puskuriuutteissa rautaa oli eniten hiilidioksidiuutetussa kauraleseen uutteessa (VTT_{CO_2}) ja vähiten ohralesekonsentraatin uutteessa (OLK_{BFO}), vaikka määrät olivatkin hieman pienempiä kuin vesiuutteissa. Radikaalinmuodostustulosten perusteella olisi voinut olettaa, että puskuriuutteissa olisi ollut eniten rautaa, mutta omat tulokset olivat päinvastaiset. Mäkisen tulosten mukaan myös viskositeetin lasku korreloi näytteiden vetyperoksidipitoisuuden ja radikaalinmuodostuksen

kanssa vesiuutteissa, mitä myös omat tulokset tukevat rautapitoisuuden osalta, mutta eivät täysin fenolisten yhdisteiden osalta. Lisäksi Mäkisen tutkimuksessa todettiin, että vähäinen mineraalien määrä voisi selittää, miksi ohrahiutaleuutteen viskositeetti pysyi stabiilina. Kuitenkin omassa tutkimuksessa juuri ohrahiutalenäytteen vesiuute sisälsi eniten rautaa, ko puskuriuutteen tulos oli määrittysrajan ulkopuolella. Toisaalta raudan reaktiivisuuteen vaikuttavat uutteissa olevat muut yhdisteet.

Tässä tutkimuksessa ei määritetty fytaattipitoisuuksia, mutta muiden yhdisteiden kelatoiva vaikutus ja fytaatin rooli uutteissa saattaa selittää myös sitä, että raudan pitoisuus ei yksinään selitä viskositeettimuutoksia aiemmin tutkituissa näytteissä. VTT_{CO2} näyteuutteissa sekä vesiuutteissa oli rautaa moninkertainen määrä muihin näyteuutteisiin verrattuna. Näin ollen voisi olettaa, että nämä näytteet sisälsivät myös eniten fytaattia; fytaatti sitoo rautaa, jolloin näiden molempien yhdisteiden pitoisuuksien voidaan olettaa olevan samassa näytteessä samankaltaiset. Jos yhdisteessä ei ole fytaattia, rauta ei sitoudu.

3.3.5 Näyteuutteiden rasvahapot ja lipidit

Näytteistä haluttiin määrittää myös lipidikoostumus, koska lipidien hapettua muodostuu hydroperoksiedeja, jotka muodostavat edelleen hajotessaan reaktiivisia radikaaleja. Tämä sekä lipidien ja beetaglukaanin hapettumisen mahdollinen yhteys voi vaikuttaa beetaglukaanin rakenteen hajoamiseen sekä viskositeetin menetykseen liuoksissa, joissa beetaglukaania on joko luonnostaan tai lisättynä. Analytiikka tehtiin vain vesiuutteille. Tulosten perusteella rasvahappoja oli eniten ylikriittisellä CO₂-uutolla valmistetussa näytemateriaalissa eli kauralesekonsentraatissa (VTT_{CO2}). Materiaali ei ole täysin rasvaton, koska ylikriittinen CO₂-uutto poistaa vain neutraalit lipidit. Jäljelle jäävien poolisten lipidien osuus kokonaislipideistä on 20 % (Zhou ym. 1999), siksi näytteessä oli myös rasvahappoja jäljellä. Näytekäsittelyt uuttoineen ja sentrifugointineen vähensivät myös rasvahappojen määrää, jolloin lopullinen analysoitu rasvahappojen määrä jäi pieneksi. Myös näytteiden esikäsittelyssä, uutossa ja pyöröhaihdutuksen jälkeisessä diklorometaaniin tapahtuvassa liuottamisessa on saattanut jäädä osa rasvahapoista uuttumatta lopulliseen näytteeseen. Vaikka määrät ja tulokset ovat lipidianalytiikan osalta viitteelliset, antavat ne vertailukelpoista kuvaa näyteuutteiden välisistä eroista lipidiprofiilin suhteen. Vähiten lipidejä löytyi jauhetusta ohrahiutaleuutteesta (Ohrh. jauhetu_{Nalle}), Monessa rinnakkaisessa

näytteessä oli vain sisäistä standardia (yht 8 näytettä, vain kahdessa oli rasvahappoja). OLK-uutteesta (BFO) (viimeinen näyte tuloksissa) ei saatu tulosta kuin kahdesta rinnakkaisesta näytteestä.

TLC-levykromatografia-ajolla oli tarkoitus analysoida vesiuutteista poolisten ja poolittomien lipidien esiintyvyyttä. Poolisia lipidejä oli kauraleseuutteesta VTT_{CO2} ja ohrahiutaleuutteesta (Ohrah. jauhettu_{Nalle}). Poolisia lipidejä oli etanolikäsitellyssä kauralesekonsentraatissa (KLK_{EtanoliSOF}). Triasyyliglyseridejä löytyi lämpökäsitelystä kauraleseuutteesta (VTT_{enstyymik}) sekä kauralesekonsentraattiuutteesta (KLK_{BFK}). Etanolikäsitellyssä kauralesekonsentraatista (KLK_{EtanoliSOF}) voitiin määrittää ainoana näytteenä poolittomia lipidejä. Lipidejä ei löydetty lainkaan kauralesekonsentraattiuutteesta KLK_{OBC15%} eikä ohralesekonsentraattiuutteesta OLK_{BFO}.

Lipidien hapettumisen tiedetään olevan merkittävä syy radikaalien muodostumiseen ja tämä voi aiheuttaa muiden komponenttien hapettumista, kuten beetaglukaanin (Wang ym. 2016). Selkeästi eniten lipidejä sisältävä näyte kauraleseuute (VTT_{CO2}) oli eniten alttiina lipidien hapettumismuutoksille. Kaura sisältää enemmän lipidejä, joiden hapettumisreaktiot voivat johtaa myös muiden komponenttien hapettumiseen, sillä lipidien hapettuminen on radikaalien tärkein lähde.

4 PÄÄTELMÄT

Viljauutteiden koostumusanalyysillä toivottiin löydettävän lisäselityksiä aikaisemmin vastaavista näyteliuoksista mitatuille radikaalinmuodostumisarvoille sekä viskositeetin menetykselle. Viskositeetin menetys ja beetaglukaanin rakenteen pilkkoutuminen ja rakenteen hajoaminen heikentävät elintarvikkeiden laatuominaisuuksia. Tämän tutkimuksen tuloksista toivottiin selittäviä syy-seuraussuhteita jo aiemmin tehdyille löydöksille.

Koska sekä ohrassa että kaurassa on nestemäisissä olosuhteissa beetaglukaanin rakenteen pysyvyyteen eri tavalla vaikuttavia seikkoja ja eri yhdisteiden pitoisuus vaikuttaa, on selkeiden syiden osoittaminen rakenteen pysyvyydessä vaikeaa.

Jo aikaisemmin on todistettu, että beetaglukaanin pilkkoutuminen on sitä merkittävämpää, mitä suurempi on mm. liuoksen rasvojen hapettumisaste, siirtymämetallien pitoisuus tai varastointilämpötila. Nämä kaikki vaikuttavat rakenteen pysyvyyteen.

Tämän tutkimuksen näytteissä kaurauutteiden puskuriuutteista eniten fenolisia yhdisteitä oli kauralesekonsentraatissa (KLK_{BPK}), jossa myös muodostui Mäkisen (2010) tutkimuksessa eniten radikaaleja. Eniten lipidejä löydettiin myös kaurauutteista, jotka menettivät viskositeettiaan eniten Mäkisen tutkimuksissa. Myös beetaglukaanipitoisuudet vastasivat toisiaan. Vaikka esim. raudan osalta tulokset eivät olleet täysin yhteneväisiä, kun ajatellaan yhteyttä viskositeetin menetykseen ja radikaalien muodostukseen, niin fytaatin rooli voi tässä selittää oletettujen yhteyksien ristiriitaa. Fytaattipitoisuutta ei tosin tässä tutkimuksessa tutkittu.

Hapettuneet lipidit ja beetaglukaanin mukana kulkeutuvat yhdisteet voivat vaikuttaa beetaglukaanin oksidatiiviseen pysyvyyteen ja niillä voi olla merkitystä beetaglukaanin teknologisessa ja fysiologisessa funktionaalisuudessa. Lisätietoa siis tarvitaan vielä monifaasisien elintarvikesysteemien vuorovaikutuksista, koska ne vaikuttavat myös tuotteessa olevan beetaglukaanin rakenteen pysyvyyteen. Etenkin kaura ja kaurapohjaiset tuotteet ovat edelleen hyvin ajankohtaisia ja kasvava trendi elintarviketeollisuudessa, ja niihin varmasti jatkossa panostetaan yhä enemmän. Rakenteen pysyvyyden lisäksi elintarvikkeissa beetaglukaanin pilkkoutuminen voi olla kuitenkin olla myös tavoiteltua, esimerkiksi kaurapohjaisissa juomissa. Elintarvikkeiden komponenttien vuorovaikutusten ymmärtäminen on tärkeää, jotta kuluttajille saadaan prosessoituja tuotteita, joissa kauran ja

ohran beetaglukaanin liittyviä terveysväitteitä voidaan käyttää sen lisäksi, että tuotteiden fysikaaliset ominaisuudet ovat halutun kaltaisia.

5 LÄHDELUETTELO

- Anttila, H., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H. 2004. Viscosity of beta-glucan in oats products. *Agricultural and food science*. 13:80-87.
- Ahmad, A., Anjum F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., Din A. 2009. Physicochemical and functional properties of barley β -glucan as affected by different extraction procedures. *International Journal of Food Science & Technology*. 44:181-187.
- Baik, K-B, Ullrich, S. E. 2008. Barley for food: Characteristics, improvement and renewed interest. *Journal of cereal science* 48:233-242.
- Baker, C., Orlandi, E. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299-321.
- Banas, A., Debski, H., Banaś, W., Heneen, W.K., Dahlqvist, A., Bafor, M., Gummesson, P., Marttila, S., Ekman, Å., Carlsson, A.S. & Stymne, S. 2007. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2463-2470.
- Beer, M.U., Wood, P.J., Weisz, J. & Fillion, N. 1997. Effect of cooking and storage on the amount and molecular weight of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan extracted from oat products by an in vitro digestion system. *Cereal Chemistry*, 74:705-709.
- BeMiller, J. 2007. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Second edition. AACC International.
- Berlitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. 2004. *Food Chemistry*, 3rd revised edition. s. 462
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. 91:179-194.
- Brennan, C.S., Cleary, L. J. 2005. The potential use of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D -glucans as functional food ingredients. *Journal of cereal Science* 42: 1-13.
- Delcour, J.A., Hoseney, R.C. 2010. *Principles of cereal science and technology*. Third edition. .AACC International. s.16,75-76 . s. 270
- Dendy D., Dobraszczyk B. 2001. *Cereals and cereal products, chemistry and technology*. luku 16, s. 375.yht sivuja 429. An Aspen publication.
- Dornez E, Holopainen U, Cuyvers S, Poutanen K, Delcour JA, Courtin CM, Nordlund E. 2011. Study of grain cell wall structures by microscopic analysis with four different staining techniques. *J Cereal Sci* 54:363-373
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2009). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to oat beta-glucan and lowering blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8(12), 1885 – 1900. Luettavissa: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 754, 755, 757, 801, 1465, 2934) and maintenance or achievement of a normal body weight (ID 820, 823) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 on request from the European Commission. EFSA Journal 7, 1254 – 1272. Luettavissa: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

Euroopan komission asetus [EU] N:o 432/2012. Luettavissa: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2012/432/oj>

Fry, S. 2004. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*. 161:641-675

Grimm, A., Krüger, E., Burchard, W. 1995. Solution properties of β -D-(1,3)-(1,4)-glucan isolated from beer. *Carbohydrate Polymers*, 27 : 205 – 214.

Grundt MML, Fardet A, Tosh SM, Rich GT, Wilde PJ. 2018. Processing of oat: The impact on oat's cholesterol lowering effect. *Food Funct* 9:1328–1343.

Hoffman A. 2002. Hydrogels for biomedical applications. Elsevier science. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54: 3–12.

Holtekjølén AK, Uhlen AK, Bråthen E, Sahlström S, Knutsen SH. 2006. Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. *Food Chem* 94:348-358.

Huber, K.C., BeMiller J.N. 2017. Carbohydrates. Teoksessa: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. Fennema's Food Chemistry. 5.painos. Boca Raton: CRC Press. s 92-169.

Izydorczyk, M.S., Dexter, J.E. 2008. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties and uses in food products- a review. *Food Research International* 41: 850-868.

Johansson, L. 2006. Structural analyses of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D glucan of oats and barley [Väitöskirja]. EKT-sarja 1444. Helsinki: Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. 85 s. Saatavilla: <https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/3272/structur.pdf?sequence=1>

Johansson, L., Tuomainen, P., Ylinen, M., Ekholm, L., Virkki, L. 2004. Structural analysis of water-soluble and -insoluble β -glucans of whole-grain oats and barley. *Carbohydrate Polymers* 58: 267-274.

Kesko, 2108. Ruokatrendit 2019. Luettavissa: <http://www.k-ruoka.fi/artikkelit/ruokatrendit-2019>

Kivelä, R., Nyström, L., Salovaara, H., Sontag-Strohm, T. 2009. Role of oxidative cleavage and acid hydrolysis of oat beta-glucan in modelled beverage conditions. *Journal of Cereal Science* (50):190-197.

Kivelä, R., Nyström, L., Sontag-Strohm, T. 2008. Gel structure protects cereal β -glucan from radical induced degradation in aqueous systems. *Annual transactions of the nordic rheology society vol 16*. University of Helsinki, Department of Food Technology, Helsinki, Finland.

- Kivelä, R., Gates, F., Sontag-Strohm, T. 2009 a. Degradation of cereal beta-glucan by ascorbic acid induced oxygen radicals. *Journal of Cereal Science*. 49:1-3.
- Kivelä, R. . Non-enzymatic Degradation of (1→3)(1→4)- β -D-glucan in Aqueous Processing of Oats. [Väitöskirja]. Helsinki: Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 77 s.
- Laitinen, R., Toivonen, J. 1982. Yleinen ja epäorgaaninen kemia. 339s.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Micha-Screttas, M., Steele, B.R. 2004. A comparative study on structure-function relations of mixed-linkage (1→3), (1→4) linear β-D-glucans. *Food hydrocolloids* 18:(837-855).
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. 2007. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of cereal science*. Vol 46, 2:101-118.
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chemistry* 101: 1151-1157.
- Lloyd R., V., Hanna, P., M., Mason, R., P. 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction.. *Free Radical Biology & Medicine*. Volume 22 :885-888.
- Mattila, P., Piironen, V., Ollilainen, V. 2001. *Elintarvikekemian ja-analytiikka*. s. 192. Yliopistopaino. Helsinki. s. 110-111.
- McClements DJ, Decker EA. 2008. *Lipids*. Teoksessa: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. *Fennema's Food Chemistry*. 4.painos. Boca Raton: CRC Press. s 155-216.
- McNeil, M., Darvill, A., G., Fry, S., C., Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53:625-663.
- Min, D. B; 1998. Lipid oxidation of edible oil. Teoksessa C.C. Akoh & D.B. Min (toim.) *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New Yourk: Marcel Dekker, INC., 283-296)
- Mäkelä, N., 2017. Cereal β-glucan in aqueous solutions: oxidation and structure formation. [Väitöskirja]. Helsinki: Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 82 s.
- Mäkelä, N. ym. 2017. Gelation of cereal β-glucan at low concentration. *Food Hydrocolloids* 73:60-66.
- Mäkinen, O., 2010. Beetaglukaanipitoisten viljauutteiden viskositeetti ja reaktiivisten happiyhdisteiden muodostuminen. [Maisterin tutkielma]. EKT-sarja 1461. Helsinki: Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 80s.
- Nacz, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 43, 5: 1523-1542
- National Center for Biotechnology Information 2020. PubChem Compound Summary for CID 996, Phenol. Vierailtu 1.11.2020. Saatavilla: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol>.

National Center for Biotechnology Information 2020. PubChem Compound Summary for CID 445858, Ferulic acid. Vierailtu 1.11.2020. Saatavilla: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>.

Osborne TB. 1924. The vegetable proteins. Longmans Green and Co., New York.

Quinde-Antell, Z., Baik, B.-K. 2006. Phenolic compounds of Barley Grain and their implication in food product discoloration. *Journal of agricultural and food chemistry* 54:9978-9984.

Ragaei S., Abdel-Aal E.-S., Noaman M., 2006. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry* 98:32-38.

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G.. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, vol 20, 7: 933-956.

Salo-Väänen, P. 1996. elintarvikkeiden proteiinipitoisuuden määrittäminen niiden typpi- ja amonihappopitoisuuksien avulla. [Väitöskirja]. EKT-sarja 1050. Helsingin yliopisto, 1995s.

Saulnier, L., Gévaudan, S., Thibault J-F. 1994. Extraction and Partial Characterisation of β -glucan from the Endosperms of two Barley Cultivars. *Journal of cereal Science* 19: 171-178.

Schaich KM, Fereidoon S, Ying Z, Eskin NAM. 2013. Lipid Oxidation. Teoksessa: Eskin NAM, Shahidi F. *Biochemistry of Foods*. 3.painos. Academic Press. s 419-478.

Shewry PR. 1993. Barley seed proteins. Teoksessa: MacGregor AW, Bhatti RS, toim. *Barley: chemistry and technology*. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists. s 131-97.

Simonsen, H., Nielsen, M., Christensen, N., Christensen, U., Cour, T., Motawia, M., Jespersen, B., Engelsen, S., Møller, B. 2007. Molecular interactions between barley and oat β -glucans and phenolic derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57:2056-2064.

Stone, B. 2006. Explorations of the cell walls of grasses and cereals. Teoksessa: *The science and lore of the plant cell wall. Biosynthesis, structure and function*. Hayashi, T. (toim.) BrownWalker Press.

Taleva-Naakka, S. 2007. Fenyylipropanoidien, erityisesti ferulahappojen hapettavat kytketymisreaktiot kasvin soluseinän biosynteesissä. [Pro-Gradu-tutkielma]. Helsinki: Helsingin yliopisto, kemian laitos. 69 s.

Viljanen, K. 2005. Protein oxidation and protein-lipid interactions in different food models in the presence of berry phenolics. [Väitöskirja]. EKT-sarja 1342. Helsinki: Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 87s.

Vreeburg, R. Fry, S. 2005. Reactive oxygen species in cell walls. Teoksessa: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Smirnoff, N. (toim.) Blackwell Publishing.

Wang, Y-J., Mäkelä, N., Maina, N.H, Lampi, A.-M., Sontag-Strohm, T. 2016. Lipid oxidation induced oxidative degradation of cereal beta-glucan. *Food Chemistry*. 197 (part B): 1324-1330

Wang, Y-J. 2018. Role of lipids and phytate in oxidative stability of cereal beta-glucan. [Väitöskirja]. Helsinki: Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 68s.

Wong, S. Leong, L. Koh, J. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry 99:775-783.

Wood, P.J. 2002. Relationships between solution properties of cereal β -glucans and physiological effects- a review. 13: 313-320.

Zhou, M., Robards, K., Glennie-Holmes, M., Helliweill, S. 1999. Oat lipids. JAOCS 76(2):159-169.

LIITTEET

Liite 1. Analyyseissä käytetty laitteisto

Liite 2. Analyyseissä käytetyt reagenssit ja liuottimet

Liite 1. Analyyseissä käytetty laitteisto**Näytevalmistus:**

Heidolph inkubator 1000

Heidolph Unimax 1010

Käytetty sentrifuugi: Sorvall RC-5C

pH-mittari: PHM210, elektrodi InLab S/N 9361284

Kivennäisaineanalyysi:

Näytteiden punnitukseen käytetty vaaka: Precisa 610 MC Floating Range, laitenro 5974 (ykem)

Standardien punnituksessa käytetty vaaka: AG 204 Delta Range, vaakanro 11, laitenro 7066

ICP-laite: ICAP 6000 series, Thermo Scientific

mikroaaltopolttolaite: MarsXPress, MMEKO 13020

Proteiinimääritys:

Dumas-analyysilaite: Vario Max CN, laitenumero 12311

Käytetty ohjelma: Plant500

Punnituksissa käytetty analyysivaaka: Precisa 180A, laitenumero 2895

Fenoliset yhdisteet:

UPLC-laitteisto (Ultra Performance Liquid Chromatograph):

Waters Acquity, USA

Detektori: Waters Acquity, FLR fluoresenssidetektori, PDA diodirividetektori

Käytetty kolonni: Waters HSS T3, 21mmx150 mm, 1,8 µm.

Laitteiston ohjaus ja aineiston keräys. Ohjelmisto: Empower2-tietokoneohjelma, Build Nro 2154

Lämpöhaude: Grant GLS400 (emäshydrolyysi)

Käytetty sentrifuugi: Sorvall RC-5C

Käytetty vaaka: Sartorius ME5, tunnistus 11150

Beetaglukaanimääritys:

Vesihaude, Grant OLS 200

sentrifuugi Eppendorf 5810R

Perkin Elmer Lambda 2 -spektrofotometri

Rasvahappoanalyysi:

Hewlett Packard HP5890 -kaasukromatografi, liekki-ionisaatiodetektor, automaattinen näytteensyöttäjä HP7673A. Laitteiston ohjaus ja tulosten käsittely Chem Station –ohjelmisto.

Kolonne: kapillaarikolonne NB-351 (25m x 0,32 mm, HNU- Nordion)

Uuttolaite

Ravisteleva vesihaude, Heidolph Inkubator 1000, Heidolph Unimax 1010

Sentrifugi, Sorvall RC-5C

Ultraäänihaude, Branson 5510

Pyöröhaihdutin, Heidolph VV2000

Analyysivaaka, Precisa XT220

Analyysivaaka Precisa 180A

Liite 2. Analyyseissä käytetyt reagenssit ja liuottimet

Näytevalmistus:

2 %-Na-atsidiliuos (vesiuutteisiin ja puskuriuutteisiin)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (puskuriliuos), Merck

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (puskuriliuos), Merck

Kivennäisaineanalyysi:

HNO_3 , Romil-spa, superpurity acid, H_2O_2 , Merck (märkäpolttoliuos)

Standardinäytteet: NIST ja Flour1 (märkäpoltto)

ICP Multielement IV standardi, pitoisuus 1000 ppm (ICP-standardi kivennäisaineanalytiikkaan)

P-standardi, Accustandard Inc, Accutrace, reference Standard, pitoisuus 1000 ppm

K-standardi, Romil ltd, Prim Ag-plus cert.fer. material, pitoisuus 10000 ppm

Beetaglukaanimääritys:

Megazyme standardi; (1-3)(1-4) Beta-Glucan Kit

8,8% Beta-Glucan (kuivapaino), kosteuspitoisuus 10,7%

50% v/v etanoli (etax)

Na-fosfaattipuskuri (20mM), (pH 6,5)

lichenaasientsyymi

Na-asetaatipuskuri (200 mM), (pH 4)

D-glukoosistandardi (Megazyme GOPOD Kit 1mg/ml in 0,2% benzoic acid, LOT 71002)

Beta-glukosidaasi

GOPOD-reagenssi

Fenoliset yhdisteet:

A-joliuokset: A-ajoliuos; 0,95% CHOOH sekä 0,05% TFA vedessä

B-ajoliuos; 0,045 % HCOOH sekä 0,05% TFA asetonitriilissä

Käytetyt fenoliset yhdisteet (valmistaja Extrasynthese Genay, France):

gallihappo

katekiini

epikatekiini prosyaniidi B2

ferulahappo

klorogeenihappo

kahvihappo

syanidiini-3-glukosidi

sinappihappo

p-kumariinihappo

valmistaja: Sigma Chemical, Germany

Standardikantaliuos 1: kutakin fenolista yhdistettä n. 1mg 5 ml:n mittapulloon, tippa metanolia, täyttö merkkiin A-ajoliuoksella

Standardikantaliuos 2: rutiinia n. 1 mg 20ml:n mittapulloon, täyttö merkkiin 25 %:lla metanolilla vedessä

Standardikantaliuos 3: ellagihappoa n. 5 mg 50 ml:n mittapulloon, täyttö merkkiin metanolilla

Emäshydrolyysi; 1M NaOH, HCl (väkevyys 37-38%)

Rasvahappoanalyysi:

BF₃-CH₃OH- reagenssi

19:0 metyyliesteri (sisäisen standardin liuos, jossa esterää 2,5 mg)

n-heptaani

0,5 M NaOH

kylläinen NaCl-liuos

sisäisen standardin liuos: 19:0-rasvahapon metyyliesteri (250 mg/100ml:ssa heptaania)

rasvahappojen metyyliestereiden standardiseos kaasukromatografiaa varten Nu Chek Prep GLC-63 A:

	Paino-%-osuus	
12:0 Me laurate	2,0	Mettyylilauraatti
14:0 Me myristate	2,0	Mettyylimyristaatti
14:1 Me myristoleate	1,0	Mettyylimyrisoleaatti
16:0 Me palmitate	22,0	Mettyylipalmitaatti
16:1 Me palmitoleate	5,0	Mettyylipalmitoleaatti
17:0 Me heptadecanoate	10,0	Mettyyliheptadekanoaatti
18:0 Me stearate	10,0	Mettyylistearaatti
18:1 Me oleate	32,0	Mettyylioleaatti
18:2 Me linoleate	8,0	Mettyylilinoleaatti
18:3 Me linolenate	4,0	Mettyylininolenaatti
20:4 Me arachidonate	4,0	Mettyliarakidonaatti

Ajo-olosuheet:

Heliumin paine injektorissa 0,7 bar

Detektorin lämpötila 260 °C

Injektorin lämpötila 240 °C

Uunin lämpötila 160 °C

Ajo-ohjelma: 160 °C:ssa 1 min, nousu 4 °C/min loppulämpötilaan 240 °C, jossa 5 min

Näyte 1 µl